

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR

BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

Hogyan befolyásolják az 5'UTR-ban és a 3'UTR-ban található cisz elemek az mRNS-ek stabilitását?

Doktori értekezés

NYIKÓ TÜNDE

Doktori program:

Klasszikus és molekuláris genetika program, Biológia Doktori Iskola

A Doktori Program vezetője: PROF. DR. OROSZ LÁSZLÓ DSc.

A Doktori Iskola vezetője: PROF. DR. ERDEI ANNA DSc.

Témavezető: DR. SILHAVY DÁNIEL PhD, TUDOMÁNYOS TANÁCSADÓ

MEZŐGAZDASÁGI BIOTECHNOLÓGIAI KUTATÓKÖZPONT, GÖDÖLLŐ

2013.

Tartalom

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
BEVEZETÉS	5
IRODALMI ÁTTEKINTÉS	7
I. Az általános mRNS degradáció menete és jelentősége a növényekben	7
I.1. Az eukarióta mRNS szerkezete	7
I.2. Deadeniláció és 3'-5' irányú mRNS lebomlás.....	7
I.3. Decapping és 5'-3' irányú mRNS lebomlás	10
II. A mRNS szintű minőségbiztosítási rendszerek növényekben.....	11
III. Az NMD rendszer szerepe és működése eukariótákban	12
III.1. Az NMD feladata és jelentősége eukariótákban	12
III.2. Az NMD működése, <i>transz</i> és <i>cisz</i> elemei eukariótákban.....	14
III.3. Az NMD korai szakasza- a PTC azonosítása és az NMD komplex összeszerelődése a hibás mRNS-en	15
III.3.1. A hosszú 3'UTR-alapú NMD rendszer	15
III.3.2. Az intron-alapú NMD rendszer	17
III.4. Az NMD kései szakasza - a PTC-t tartalmazó mRNS lebontása	19
IV. Az 5'UTR-ban található korai nyílt leolvasási keretek (uORF) hatása a génexpresszióra.	22
V. Az NMD rendszer szabályozása eukariótákban	24
VI. A növényi NMD vizsgálatára használt tesztrendszerek.....	25
VI.1. U1DN ko-infiltráción alapuló tranzien NMD tesztrendszer	27
VI.2. VIGS kombinált tranzien NMD tesztrendszer (VIGS-NMD tesztrendszer)	30
CÉLKITŰZÉSEK.....	33
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	35
I. Felhasznált anyagok	35
I.1. Növények	35
I.2. Agrobaktérium törzs	35
I.3. Expressziós vektorok és NMD tesztkonstrukciók.....	35
II. Felhasznált módszerek	37
II.1. RT-PCR (reverz transzkripció).....	37
II.2. PCR-mutagenézis	37
II.3. Agroinfiltrálás	38
II.4. Vírus indukálta géncsendesítés (VIGS).....	38
II.5. RNS kivonás növényi szövetből.....	39
II.6. Northern blot	39
II.7. Kvantitatív PCR (qPCR)	40
II.8. Fehérje kivonás növényi szövetből	40

II.9. Western blot.....	40
EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK	42
I. Az uORF mint új NMD <i>cis</i> elem a növényekben.....	42
I.1 Az uORF méretfüggő NMD <i>cis</i> elem a növényekben.....	46
I.2 Nem a reiniciáció védi meg a rövidebb uORF-al rendelkező mRNS-eket az NMD-től	48
I.3 Az uORF-ot tartalmazó gének csak kis része állhat NMD szabályozás alatt.....	50
II. Az intron-alapú növényi NMD rendszer működése és szabályozása	52
II.1 Az EJC faktorok a növényi intron-alapú NMD-ben is fontos szerepet játszanak	55
II.2 A riboszómához kapcsolt PYM fehérje lehet a felelős a növényi EJC reciklizációjáért	57
II.3 A növényi intron-alapú NMD feltételezett működési mechanizmusa	59
II.4 Az eukarióta NMD rendszer evolúciója	61
II.5 A növényi NMD rendszer szabályozása.	63
II.5.1 Az SMG7 megvalósítja mindkét típusú növényi NMD autoregulációját	64
II.5.2 Az SMG7 3'UTR-jában található stop közeli intron elősegíti az NMD releváns intron kivágódását	66
II.5.3 A növényi intron-alapú NMD rendszer szabályozása.....	69
II.5.4 Az NMD rendszer autoregulációja eukariótákban	71
AZ ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALVA.....	75
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	76
IRODALOMJEGYZÉK	77
AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ SAJÁT KÖZLEMÉNYEK.....	84
AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓ EGYÉBB KÖZLEMÉNYEK	84
NEMZETKÖZI KURZUSOK, ÖSZTÖNDÍJAK	85
TUDOMÁNYOS ELŐADÁSOK.....	85
SUMMARY	86
ÖSSZEFOGLALÁS.....	87
FÜGGELÉK	88
I. NMD tesztkonstrukciók klónozásának részletes leírása	88
II. DNS oligonukleotidok listája	90
III. Az SMG7 és a Barentsz NMD faktorok 3'UTR szerkezete zárvatermőkben.	93

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AS	- (amino acid) aminosav
CBP	- (cap-binding protein) sapka-kötő fehérje
cDNS	- (complementer DNA strand) komplementer DNS szál
DCP	- (decapping protein) sapka eltávolító fehérje
dpi	- (day post infiltration) infiltrálást követő nap
EJC	- exon-junction complex
eRF	- (eukaryotic Release Factor) eukarióta terminációs faktor
GFP	- (green fluorescent protein) zöld fluoreszcens fehérje
mRNP	- (mRNA ribonucleoprotein complex) mRNS-fehérje (ribonukleoprotein) komplex
mRNS	- (messenger RNA) hírvívő RNS
NGD	- No-go decay
NMD	- Nonsense-mediated mRNA decay
NSD	- Non-stop decay
nt	- (nucleotide) nukleotid
PABP	- (Poly, {A} binding protein) Poly(A)-kötő fehérje
PDS	- (phytoene desaturase) fitoén deszaturáz- növényi gén
PTC	- (premature termination codon) korai stop kodon
rpm	- (revolution per minute) percenkénti fordulatszám
TRV	- (<i>Tobacco rattle virus</i>) dohány zörgőlevelűség vírus
uORF	- (upstream Open Reading Frame) egy gén 5' UTR-jában lévő nyílt leolvasási keret
UPF	- up frameshift
UTR	- (untranslated region) nem-transzlálódó régió
VIGS	- (Virus induced gene silencing) vírus indukálta géncsendesítés

BEVEZETÉS

Az mRNS-eknek a transzkripciót követő érés során számos „minőségellenőrzési ponton” kell átmenniük, amelyek biztosítják, hogy csak a hibátlan mRNS-ek transzlálódjanak. Az evolúció során számos, az eltérő típusú hibás mRNS-et hatékonyan felismerő és degradáló rendszer alakult ki. A korai stop kodont (PTC) tartalmazó hibás mRNS-ek különösen veszélyesek, hiszen ezekről csonka fehérjék keletkezhetnek, melyek gyakran domináns-negatív hatásúak és különböző betegségek kialakulásához vezethetnek. Azonosításukért és degradációjukért egy eukariótákban konzervált mRNS szintű minőségbiztosítási rendszer, a Nonsense-mediated mRNA Decay (NMD) felel. Az NMD a hibaelhárító funkciója mellett alapvető szerepet tölt be az endogén génszabályozásban is (Behm-Ansmant *et al.*, 2007). Az NMD kulcsfontosságú *transz* faktorai a UPF1, a UPF2 és a UPF3 fehérjék az élesztőtől az emlősökig konzerváltak (Shyu *et al.*, 2008; Hwang and Maquat, 2011). Eltérőek azonban az NMD *cisz* elemei, azok a szekvenciák, illetve struktúrák, amelyek alapján az NMD rendszer megkülönbözteti a PTC-ket a valódi stop kodonoktól. Élesztőben és gerinctelenekben az NMD rendszer azokat a stop kodonokat azonosítja PTC-ként, amelyek után a 3' nem transzlálódó régió (3'UTR) szokatlanul hosszú (hosszú 3'UTR-alapú NMD) (Gatfield *et al.*, 2003; Amrani *et al.*, 2004). A hosszú 3'UTR miatt a transzláció befejezésért felelős terminációs komplex nem éri el a polyA végen elhelyezkedő, a terminációt segítő polyA kötő fehérjét (PABP), így a termináció lelassul. A lassú termináció hibát jelez, melynek következtében az mRNS-en kialakul a UPF1-UPF2-UPF3 fehérjékből álló NMD komplex, ami a mRNS degradációját eredményezi. Gerincesekben ezzel szemben az NMD azokat a stop kodonokat ismeri fel PTC-ként, amelyek után a 3'UTR régióban intron(ok) található(ak) (intron-alapú NMD) (Le Hir and Seraphin, 2008). Az intron kivágódás során ugyanis a mRNS-re rakódik egy fehérje komplex, az Exon Junction Complex (EJC), amely kötő felszínként szolgál a UPF3-UPF2 NMD *transz* faktorok számára. Normális esetben, ha az EJC a mRNS kódoló régiójában van, a riboszóma a transzláció során lelöki a mRNS-ről. Ha azonban az EJC a 3'UTR-ban helyezkedik el, a stop kodonnál elhelyezkedő riboszóma nem képes eltávolítani, így összerakódik rajta az NMD komplex és a mRNS gyorsan lebomlik (Chang *et al.*, 2007; Le Hir and Seraphin, 2008; Dagenet *et al.*, 2012). Bár az NMD rendszer kulcsfontosságú biológiai folyamatokban játszik szerepet, és emlősökben, *Drosophila*-ban illetve élesztőben is igen jól jellemzett, a növényi NMD-ről munkánk kezdetekor nagyon keveset tudtak. Csoportunk korábbi munkája során kidolgozott

egy hatékony tranziens növényi NMD tesztrendszer, amely alkalmas a növényi NMD *cisz* és *transz* elemeinek vizsgálatára (Kertész *et al.*, 2006). Ennek segítségével sikerült azonosítani a növényi NMD *cisz* és *transz* elemeit. Igazolták, hogy a növényekben a hosszú 3'UTR-alapú és az intron-alapú NMD egyaránt működik. Azonosították a növényi NMD fő *transz* faktorait, a UPF1, a UPF2, a UPF3, és az SMG7 géneket, majd kísérletek sorozatával bizonyították, hogy ez a négy faktor szükséges mind a hosszú 3' UTR-alapú, mind az intron-alapú növényi NMD-hez. Azonosították az emlős EJC két fehérje komponensének (Y14 és Mago) növényi ortológját is, és igazolták, hogy ezek csak az intron- alapú NMD-ben játszanak szerepet (Kerényi *et al.*, 2008). Az intron-alapú NMD rendszert előttünk kizárólag a gerincesekben mutatták ki és feltételezték, hogy az NMD ezen komplexebb ága, csak a gerincesekben alakult ki (Rehwinkel *et al.*, 2006; Durand és Lykke-Andersen, 2011). Érdekes volt így csoportunk eredménye, miszerint az intron-alapú NMD növényekben is hatékonyan működik. Munkám egyik fő célja volt kideríteni, hogy növényekben a hosszú 3'UTR-on és a 3'UTR-ban található intronokon kívül más NMD *cisz* elemek is találhatók-e. Kutatásom második részében a növényi intron-alapú NMD pontos működési mechanizmusának feltárását tűztük ki célul. Elsősorban arra voltunk kíváncsiak, hogy a növényi intron-alapú NMD működését, *cisz* és *transz* elemeit tekintve mennyire hasonlít (vagy tér el) a gerincesekben leírt intron-alapú NMD-től. Ha kiderül, hogy a növényi intron-alapú NMD egy konzervált, a gerincesekben is működő ága az NMD-nek, akkor újragondolhatjuk az NMD evolúciójáról korábban felállított modellt.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

I. Az általános mRNS degradáció menete és jelentősége a növényekben

I.1. Az eukarióta mRNS szerkezete

Az eukariótákban a gének kifejeződése bonyolult, több szinten szabályozott folyamat, ami lehetővé teszi, hogy az adott körülmények között csak a szükséges fehérje termékek keletkezzenek. A mRNS-ek szelektív lebontása a génszabályozás egyik fontos állomása, ami a mRNS szintézis mellett nagyban hozzájárul ahhoz, hogy a sejtek fehérje készlete nagyon gyorsan az aktuális igényeknek megfelelően cserélődhessen. Eukariótákban a mRNS érés során sokszor hibás mRNS termékek is keletkeznek, melyek eltávolítását szintén a mRNS degradációs folyamatok biztosítják. A mRNS degradáció tehát, mennyiségi szabályozást és minőségi ellenőrzést egyaránt képes biztosítani a génkifejeződés során. Az eukarióta, így a növényi mRNS-ek féléletideje általában igen hosszú. Ez a nagyfokú stabilitás annak köszönhető, hogy a mRNS-ek fehérjékkel körülvett, zárt-gyűrű szerkezettel rendelkeznek, ami védi őket a különböző RNS degradációs enzimektől. Ez a stabil mRNS-fehérje komplex (ribonukleoprotein- mRNP komplex) a mRNS érés során alakul ki. A mRNS 5' és 3' végeinek a beburkolása, ezáltal a lebontó enzimektől (exonukleázoktól) való védelme a legfontosabb. A mRNS 5' végére egy sapka (cap) struktúra, a 3' végére pedig egy poly(A) fark rakódik. Az 5' végén található sapkához a sapka-kötő fehérjék (Cap Binding Proteinek, továbbiakban CBP) kapcsolódnak, míg a 3' vég poly(A) farkához a Poly(A)-kötő fehérje (Poly(A) Binding Protein, továbbiakban PABP) kötődik (Moore és Proudfoot, 2009). A mRNS zárt-gyűrű szerkezete a PABP és a CBP fehérjék közötti fizikai kölcsönhatás révén valósul meg (Általános ábra 1.). Ez a kölcsönhatás fontos szerepet játszik a transláció iniciációjának szabályozásában is. A mRNS kötő fehérjék irányítják ezen kívül a mRNS-ek érését és a sejtmagból a citoplazmába való szállítását is (Houseley és Tollervey, 2009).

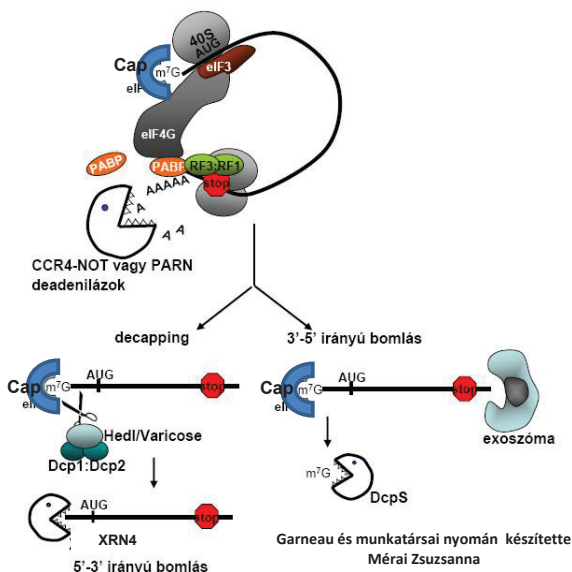
I.2. Deadeniláció és 3'-5' irányú mRNS lebomlás

A mRNS lebontásához a zárt-gyűrű szerkezet felbontására van szükség, hiszen ebben a formában az exonukleázok nem férnek a mRNS-hez. Ez az esetek nagy részében a poly A farkat eltávolító deadenilázok közreműködésével történik, melyek addig bontják a 3' végről a poly(A) farkat, amíg az egy kritikus szint alá (20 nt) nem csökken. Ilyenkor a PABP leesik a

túl röviddé vált poly(A) farokról. A deadenilált mRNS-ekhez emlősbén és élesztőben a Pat és az LSM komplexek kapcsolódnak, amelyek a mRNS decappinget (az 5'sapka {cap} eltávolítása) aktiválják, azaz a deadenilációt gyors decapping követi (Tharun, 2009). Mivel az LSM és a PAT komplexek megtalálhatóak növényekben is, valószínű, hogy a deadeniláció és a decapping hasonló módon történik növényekben, mint élesztőben és állatokban (Goeres *et al.*, 2007). A deadeniláció és a decapping következtében felbomlik a zárt-gyűrű szerkezet és a mRNS két vége hozzáférhető lesz a 3'-5', illetve az 5'-3' exonukleázok számára, így a mRNS degradáció visszafordíthatatlanul bekövetkezik (Általános ábra 1.).

A mRNS degradáció fő sebesség megszabó lépése a deadeniláció. A poly(A) farkok rövidülése (deadeniláció) ugyanis fokozatosan, lassan megy végbe, miközben a mRNS translációk sorozatán esik át. Ennek magyarázatára élesztőben és emlősökben találtak rá. Kimutatták, hogy a transláció terminációjakor a terminálódó riboszómához kapcsolódik az eRF3 (eukaryotic Release Factor 3), amely köti a PABP-t. Az eRF3-PABP kapcsolat azon kívül, hogy elengedhetetlen a hatékony terminációhoz, feltehetően elősegíti a deadenilázok kötődését is a PABP-hez (Funakoshi *et al.*, 2007). Feltételezik, hogy ennek következtében a deadeniláz minden egyes terminációs lépésnél rövidíti a poly(A) farkat, így az egyre rövidebb lesz ahogy a mRNS a translációk sorozatán esik át. Amikor a poly(A) fark a 20nt-os kritikus szint alá csökken, már nem képes megkötni a PABP-t. A deadeniláció reverzibilis folyamat, a citoplazmában lévő polimerázok képesek újraszintetizálni a poly(A) szignált. Ha azonban a PABP leválása után bekövetkezik a mRNS decapping is, a degradáció visszafordíthatatlanul és gyorsan bekövetkezik. Eukariótákban 3 deadeniláz komplex ismert, a PAN2-PAN3, a CCR4-CAF1 (CCR4-NOT) és a PARN. Emlősökben a PAN komplex rövidíti a poly(A) farkat kb. 100-80 A-ig, ezután a CCR4-CAF1 komplex veszi át és fejezi be a deadenilációt (Parker és Song, 2004; Chen *et al.*, 2008). A PARN komplexet élesztőkben nem azonosították, gerincesekben pedig speciális funkciója van, az anyai hatású mRNS-ek deadenilációját végzi. A citoplazmás deadeniláció nagy részét ellátó, fő deadeniláz komplex élesztőben és gerincesekben is a CCR4-CAF1 (Garneau *et al.*, 2007). Növényekben két deadeniláz komplex, a PARN és a CCR4-CAF1 fehérje komplex működik. A PAN komplex ortológjai nem azonosíthatóak. Bár az egyelőre nem tisztázott, hogy növényekben melyik deadeniláz komplex a fontosabb, az tény, hogy ezek nem redundánsak. A *parn* mutánsokban ugyanis, a növényi mRNS-ek csak egy részének szintje emelkedik meg, megerősítve, hogy a deadenilációs útvonalak target specifikusak (Reverdatto *et al.*, 2004). A PARN komplexnek a gerincesekhez hasonlóan, a növényekben is fontos szerepe van az embriogenezisben szerepet játszó mRNS-ek

deadenilációjában. Nem meglepő ezért, hogy a PARN null-mutáció *Arabidopsis* embriókban letális (Liang *et al.*, 2009). Míg a PARN génből növényekben csak egy példány van, addig a CAF1-nek és a CCR4-nek számos (kb.11) homológját azonosították *Arabidopsisban* (Belostotsky és Sieburth, 2009). Az, hogy ezek mind aktív fehérjét kódolnak-e egyelőre nem bizonyított. Az eddigi kísérletek azt mutatják, hogy a vizsgált homológok részben redundánsak, de rendelkeznek bizonyos fokú target-specifitással is. Így például mind az *Arabidopsis* CAF1a, mind az *Arabidopsis* CAF1b szükséges a sebzésre adott válaszhoz, az ozmotikus stressz válaszában viszont csak az *Arabidopsis* CAF1a játszik szerepet (Walley *et al.*, 2010). Valószínűleg ezzel a részbeni redundanciával magyarázható, hogy a CAF1 mutáns növények csak gyengébb rendellenességeket mutatnak. A CAF1a homológ hiányában például a növények lassabban növekedtek és fogékonyabbak voltak bizonyos betegségekre, túlexpressziója pedig épp az ellenkezőjét, gyors növekedést és betegségekkal szembeni ellenállást adott a növénynek (Sarowar *et al.*, 2007).



Általános ábra 1. Az általános mRNS degradáció menete növényekben

A deadeniláció után a mRNS-eket a 3'-5' irányban emésztő exonukleáz, a 10-12 alegységből álló exoszóma támadja, illetve a decapping-et követően elérhetőek az 5'-3'

exonukleázok számára is (Általános ábra 1). Kimutatták, hogy a növényi exoszóma különböző alegységei különböző mRNS-készlet lebontásához szükségesek (Belostotsky és Sieburth, 2009).

1.3. Decapping és 5'-3' irányú mRNS lebomlás

A decapping általában a deadenilációt követi, de a mRNS zárt-gyűrű szerkezete deadeniláció-független decapping révén is megbontható. Ezekben az esetekben egy mRNS-kötő fehérje segíti elő a zárt, gyűrű szerkezetű mRNS decappingjét, azáltal, hogy köti a decapping komplexet vagy valamelyik decapping aktivátor fehérjét.

Az 5' sapka eltávolítását a több alegységből álló decapping komplex végzi, melynek katalitikus alegysége (DCP2), valamint az ezt segítő DCP1 is konzervált eukariótákban. Növényekben ezen kívül egy harmadik alegység a Varicose (VCS) is részt vesz a decapping stimulálásban. A *dcp1*, *dcp2* és *vcs* mutáns növények nagyon hasonló pleiotróp fenotípust mutatnak, megváltozik a kotiledon alakja és érhalózata (Goeres *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2006). Érdekes módon ez a fenotípus függ a növény genotípusától, ugyanis a *dcp2* és a *vcs* mutáció a *Landsberg erecta Arabidopsis* genotípusban részlegesen szuppresszált. Ennek oka, hogy míg a Col-0 genotípusban egy pontmutáció működésképtelenné teszi a decapping komplexet többé-kevésbé helyettesíteni tudó SOV (suppressor of varicose) fehérjét, addig *Landsberg erecta* genotípusban ez a fehérje működőképes (Zhang *et al.*, 2010).

A decapping után az mRNS-eket az 5'-3' exonukleázok emésztik (Általános ábra 1). Növényekben három 5'-3' exonukleáz ismert, az XRN2, az XRN3 és az XRN4. Míg az XRN2 és az XRN3 a sejtmagi, addig az XRN4, amely az állatokban és az élesztőben azonosított XRN1-nek felel meg, a citoplazmás 5'-3' irányú mRNS degradációért felel (Gazzani *et al.*, 2004; Souret *et al.*, 2004). Az *xrn4* mutáns *Arabidopsis*ok fenotípusa meglepően enyhe. Ennek magyarázata lehet, hogy mivel a decapping irreverzibilis folyamat, az ezen átesett mRNS-ek már nem transzlálódhatnak, így előbb-utóbb más RNS degradációs útvonalak (pl. 3'-5'-degradáció) révén XRN4 hiányában is lebomlanak.

Eukariótákban a fokozatos deadenilációval történő 3'-5' irányú mRNS degradációs útvonal a legelterjedtebb. Abban az esetben viszont, ha nagyon gyors mRNS lebontásra van szükség (pl. gyors stressz válaszok esetén, vagy a hibás mRNS-ek eltávolításakor), akkor ezek a fokozatos deadeniláció-, illetve decapping-függő lebomlási folyamatok megkerülhetők vagy felgyorsíthatók. Így például a növényi RNS silencing rendszer, amelynek fontos szerepe van a

gyors stressz válaszok kialakításában és még sok más gyors szabályozási folyamatban, úgy kerül meg a deadenilációt, hogy elvágja a cél mRNS-t, így rögtön hozzáférhetővé teszi azt a lebontó enzimek számára. A korai stoppal rendelkező hibás mRNS-ek gyors eltávolításakor a lassú deadeniláció három módon kerülhető meg. Emlősökben, hasonlóan az RNS silencing rendszerhez indukálódhat a hibás mRNS vágása. A másik két lehetőség, hogy a mRNS-hez olyan fehérjék, vagy fehérje komplexek kötődnek, melyek felgyorsítják a deadenilációt, vagy megkerülve a deadenilációt gyors decappinget indukálnak. Ezek a gyors RNS degradációs folyamatok teszik lehetővé, hogy a mRNS-ek féléletideje az aktuális igényeknek megfelelően hatékonyan és gyorsan módosulhasson.

II. A mRNS szintű minőségbiztosítási rendszerek növényekben

Az eukarióta sejtekben képződő mRNS-ek jelentős része hibás. Ezek transzlációja megváltozott aktivitású fehérjék keletkezéséhez vezethet, ezért az evolúció során számos az eltérő típusú hibás mRNS-ket hatékonyan felismerő és degradáló úgynevezett RNS minőségbiztosítási rendszer (*RNA quality control*) alakult ki (Doma és Parker, 2006). A mRNS-ek minőségellenőrzése már a keletkezésük pillanatában a sejtmagban elkezdődik és a citoplazmában zajló transzláció befejezéséig folyamatosan zajlik, biztosítva ezáltal, hogy csak a hibátlan mRNS-(ek)ről keletkezessen fehérje. Eukariótákban eddig négy konzervált citoplazmás RNS minőségbiztosítási rendszert írtak le, amelyek különböző mechanizmusok alapján ismerik fel, majd indukálják a más-más típusú hibás mRNS-ek lebontását. A stop kodon nélküli mRNS-ek azonosítását és lebontását a Non-stop decay (NSD) rendszer végzi (Doma és Parker, 2006). A No-go decay (NGD) rendszer ezzel szemben azokat a mRNS-ket degradálja, melyeken a transzláció elongációja valamiért (ált. hibás nukleotidok, másodlagos szerkezetek) elakad (Frischmeyer *et al.*, 2002). A NGD és a NSD rendszerekről növényekben nagyon keveset tudunk, de mivel igen ősi, valószínűleg minden eukariótában aktív rendszerekről van szó, így feltehetőleg növényekben is működnek. Ezt támasztja alá, hogy a NGD fő faktorok, a Dom34 és Hbs1, növényi ortológjai könnyen azonosíthatóak (Atkinson *et al.*, 2008). Az RNS silencing (Géncsendesítés) és az NMD mRNS minőségbiztosítási rendszerekről jóval többet tudunk. Az RNS silencing a dupla szálú RNS-ek (dsRNS-ek) és az ezekkel szekvencia hasonlóságot mutató nukleinsavak inaktivációja, illetve a cap vagy poly(A) nélküli transzkriptumok degradációja révén részt vesz a vírusok és transzpozonok elleni védekezésben. Szerepe van számos endogén gén transzkripcionális és poszttranszkripcionális (TGS, PTGS) szabályozásában is. Az NMD felismeri és lebontja a korai stop kodont (PTC) tartalmazó mRNS-eket, megakadályozva így a csonka, gyakran

domináns-negatív hatású fehérjék képződését. Az NMD mechanizmusát az alábbiakban bővebben ismertetem.

III. Az NMD rendszer szerepe és működése eukariótákban

III.1. Az NMD feladata és jelentősége eukariótákban

Az NMD a PTC-t tartalmazó hibás mRNS-ek azonosításáért és degradációjáért felel, ezáltal megakadályozza a csonka, gyakran domináns-negatív-hatású fehérjék keletkezését. A csonka fehérjék azért különösen veszélyesek, mert versenyeznek a normál vad típusú fehérjével. Gyakran képesek beépülni a vad típusú fehérje helyére a komplexekbe, de ott nem tudják ellátni a megfelelő funkciót, így megbénítják a teljes komplexet. A PTC-t tartalmazó mRNS-ek származhatnak olyan mutáns génekről, melyeknek kódoló régiójában pontmutáció, delécio, inszercio történt vagy keletkezhetnek vad típusú génekről hibás transzkripció, illetve alternatív splicing révén. Az NMD fontosságát tükrözi, hogy emberben a monogénis örökölhető rendellenességek kb. egyharmadát PTC-t tartalmazó mRNS-ek váltják ki (β -thalassemia, retinitis pigmentosa, cisztás fibrózis, Duchenne izomdisztrófia stb.). Az NMD rendszer ezek nagy részét felismeri és degradálja, ennek következtében a betegségek nagyobb része recesszív (Thein *et al.*, 1990). Így például a sarlósejtes vérszegénység (β -thalassemia) esetén az NMD tünetmentessé teszi a heterozigóta β -globin mutációt, ugyanis lebontja a hibás allélről keletkező PTC tartalmú mRNS-eket. A másik allélről keletkező hibátlan β -globin fehérjék szintje általában elegendő, hogy biztosítsa az oxigénzállítást. Előfordul azonban, hogy az NMD valamiért nem képes felismerni a PTC-t tartalmazó aberráns mRNS-eket, így azok transzlálódhatnak, és a képződő mutáns fehérjék domináns-negatív módon betegséget okozhatnak (Kuzmiak és Maquat, 2006). A sarlósejtes vérszegénység súlyos tüneteit egy korai PTC-t tartalmazó mRNS okozza, melyet az NMD nem ismer fel, így az arról keletkező domináns-negatív mutáns hemoglobin fehérjék mérgező fehérje aggregátumokat képeznek (Thein *et al.*, 1990).

Az NMD hibaelhárító funkciója mellett alapvető szerepet tölt be az endogén génszabályozásában is (Behm-Ansmant *et al.*, 2007). NMD mutáns növényekben a gének 2-3%-nak, élesztőben, *Drosophilában* és állatokban a gének mintegy 5-10 %-nak expressziója nő. Ezek a gének lehetnek direkt NMD célpontok, de lehetnek olyan indirekt targetek is, melyeket az NMD által befolyásolt faktorok szabályoznak. A növényi NMD például fontos szerepet játszik a splicing faktorok direkt szabályozásában. Ezáltal a splicingon áteső mRNS-ek indirekt szabályozását is érintheti (Saiprasad *et al.*, 2007). Növényekben kimutatták, hogy

az NMD-nek nem csak a fehérje kódoló gének szabályozásában, hanem az úgynevezett mRNS-szerű nem kódoló RNS-ek (mRNA-like noncoding RNA) szabályozásában is szerepe van, sőt az utóbbiaknak sokkal nagyobb hányadát szabályozza (Kurihara *et al.*, 2009). Ennek alapján a növényi NMD egyik fontos szerepe a nem-kódoló RNS-ek szabályozása.

Annak ellenére, hogy az NMD szerepe a vad típusú endogén gének szabályozásában köztudott, az ehhez köthető pontos biológiai funkciói csak kevésbé ismertek. Megfigyelték viszont, hogy az NMD hiánya, a magasabbrendű eukariótákhoz képest, alacsonyabb rendű élőlényekben enyhébb tüneteket mutat. Feltételezik, hogy ez összefüggésben lehet az alternatív splicing gyakoriságával. Gerincesekben ugyanis majdnem minden mRNS-nek van egy vagy több alternatív splicinggal keletkező terméke (Lewis *et al.*, 2003). Az alternatív splicing növényekben is nagyon gyakori, az intront tartalmazó növényi gének kb. 40%-áról képződnek alternatív splicing termékek, amelyek jelentős része korai stop kodont tartalmaz (Filichkin *et al.*, 2010). *Drosophilában* bár jóval ritkábban, de előfordul az alternatív splicing, az élesztőben azonban lényegében már nem beszélhetünk róla. Ennek megfelelően emlősökben, zebrahalsban, *Drosophilában* és *Arabidopsisban* a fő NMD faktorok null mutációja letalitást okoz (McIlwain *et al.*, 2010; Medghalchi *et al.*, 2001; Riehs *et al.*, 2008; Wittkopp *et al.*, 2009; Yoine *et al.*, 2006). *C.elegansban* az NMD hiányában csak az ivarszervek morfológiai rendellenességei figyelhetők meg, élesztőben pedig az NMD hiánya nem okoz látható tüneteket (Pulak és Anderson, 1993; Amrani *et al.*, 2006).

Növényekben a UPF1, a UPF3 és az SMG7 NMD faktorok hipomorf mutánsai (*upf1-5*, *upf3-1*, *smg7-1*) hasonló, pleiotróp fenotípust mutatnak. Fűrészkes levelek, abnormális és késői virágfejlődés volt kimutatható, ami arra utal, hogy az NMD-nek növényekben is fontos szerepe van a fejlődés szabályozásában (Hori és Watanabe, 2005; Yoine *et al.*, 2006). Nemrég rámutattak arra is, hogy ezekben az NMD mutáns növényekben jelentősen megnő a szalicilsav (SA) indukálta patogén válaszban (*SA-responsive defense mechanism*) szerepet játszó gének szintje (Jeong *et al.*, 2011; Kearnan *et al.*, 2012; Rayson *et al.*, 2012). Úgy tűnik ezek alapján, hogy a növényi NMD-nek szerepe van a patogén válasz csendesítésében is, azáltal, hogy gátolja a patogén válasz génjeinek kifejeződését. Az NMD ezáltal egyfajta költségtakarékos szabályozást valósíthat meg, ha nincs szükség patogén válaszra, nem termelődnek feleslegesen ezek a géntermékek.

III.2. Az NMD működése, *transz* és *cisz* elemei eukariótákban

Az NMD működéséről élesztőben, egyes gerinctelen modell élőlényekben (*Drosophila*, *C. elegans*), illetve emlősökben igen sokat tudunk. Bár a növényi NMD vizsgálatok csak néhány éve kezdődtek, ma már -részben csoportunk korábbi munkái révén- a növényi NMD mechanizmusáról is elég sok adat áll rendelkezésünkre.

Az NMD központi fehérjéi, *transz* faktorai, a UPF1, a UPF2 és a UPF3 fehérjék az élesztőtől az emlősökig konzerváltak (Hwang és Maquat, 2011). Állatokban azonban, ahol az NMD komplexebb, számos olyan NMD *transz* faktort azonosítottak, melyek az élesztőben nem találhatók meg. Ilyenek a UPF1 foszforilációs ciklusában szerepet játszó SMG1 kináz, illetve a defoszforilációban részt vevő SMG5, SMG6 és SMG7 fehérjék. Gerincesekben kimutatták, hogy az EJC fehérje komplex 4 központi faktora, az Y14, a Mago, az eIF4AIII (4A3) és a Barentsz (Lejeune és Maquat, 2005; Longman, 2007), is szükséges az NMD-hez. Csoportunk munkája során kiderült, hogy a növényi NMD-ben is kulcsszerepet játszanak a fő UPF1, UPF2, UPF3 és SMG7 faktorok. Eddigi eredményeink viszont arra is utalnak, hogy a UPF3 talán kevésbé fontos a növényi NMD-hez. Ezen kívül a növényi Y14 és Mago faktorokat is sikerült azonosítani és igazolni, hogy növényekben is szerepük van az NMD-ben (Kerényi *et al.*, 2008).

Az NMD *cisz* elemei azok a szekvenciák, illetve struktúrák, amelyek alapján az NMD *transz* faktorai elkülönítik a PTC-t tartalmazó mRNS-eket a vad típusú normál stop kodonnal rendelkező mRNS-ektől. Élesztőben, gerinctelenekben (*Drosophila*, *C. elegans*) és növényekben az NMD rendszer azokat a stop kodonokat azonosítja koraiként (PTC), amelyek után a 3'UTR szokatlanul hosszú (továbbiakban hosszú 3'UTR-alapú NMD) (Amrani *et al.*, 2004; Kertész *et al.*, 2006; Longman, 2007). Ezzel szemben az intron gazdag genommal rendelkező gerincesekben az NMD főként azokat a mRNS-eket támadja, amelyek 3'UTR-jában, a stop kodontól legalább 50 nukleotidra egy intron található (továbbiakban intron-alapú NMD) (Nagy és Maquat, 1998; Chang *et al.*, 2007). Növényekben a hosszú 3'UTR-alapú NMD mellett, az intron-alapú NMD is működik (Kerényi *et al.*, 2008). Jelenlegi ismereteink szerint csak a növényekben működik mindkét NMD rendszer hatékonyan.

Az NMD a transláció terminációjához szorosan kapcsolódó folyamat, melyet két szakaszra oszthatunk: az NMD korai szakaszában a PTC azonosítása, illetve az NMD komplexnek az összeszerelődése történik. Az NMD késői szakaszában megtörténik a degradációra kijelölt mRNS lebontása. A korai szakaszban, a transláció terminációja során, a

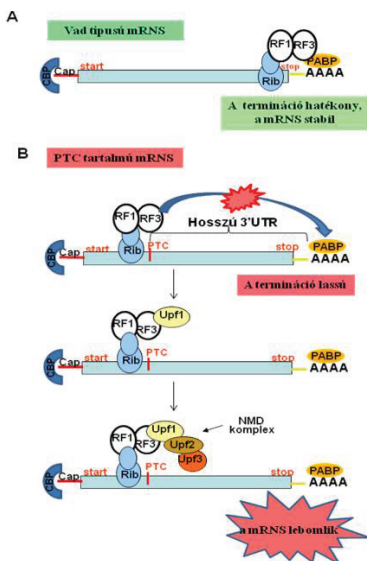
mRNS-en jelen lévő NMD *cisz* elemek hatására, a UPF1 NMD *transz* faktor képes elkülöníteni a valódi stop kodonokat a PTC-től. A UPF1 indukálja a UPF2 és UPF3 fehérjék bekapcsolódását, azaz egy funkcionális NMD komplex összeszerelődését a hibás mRNS-en. Az NMD komplex összeszerelődése után, a késői szakaszban aktiválódnak a mRNS degradációs rendszerek, amelyek a sebességmegszabó deadenilációs lépést felgyorsítva vagy megkerülve a PTC tartalmú mRNS gyors lebontását okozzák (Isken és Maquat, 2008; Muhlemann, 2008). A következőkben részletesen ismertetem, hogy pontosan hogyan történik a PTC azonosítása a két fő NMD útvonal, a hosszú 3'UTR-alapú illetve az intron-alapú NMD esetén.

III.3. Az NMD korai szakasza- a PTC azonosítása és az NMD komplex összeszerelődése a hibás mRNS-en

III.3.1. A hosszú 3'UTR-alapú NMD rendszer

A hosszú 3'UTR-alapú NMD rendszer gerinctelenekben és gerincesekben egyaránt megtalálható. Míg a gerincteleneknél ez az egyetlen elterjedt módja a PTC-t tartalmazó mRNS-ek azonosításának, addig gerincesekben az NMD egy kevésbé fontos ágát képezi. Az NMD minden élőlényben transláció termináció-függő folyamat. A hosszú 3'UTR-alapú NMD során a PTC és a normál stop kodon elkülönítése a transláció terminációjának hatékonyságán alapul. Normál stop kodon terminációjakor a riboszómához kapcsolódik az eRF1-eRF3 (eukaryotic Release Factor) fehérje komplex. Az eRF3 interaktál a 3' poly(A) szekvenciát kötő PABP-vel. Az eRF3-PABP kapcsolat biztosítja a gyors és hatékony terminációt. Ilyenkor a szintetizált fehérje, a terminációs komplex, illetve a riboszóma felszabadul, a mRNS stabil marad (Áltanos ábra 2A). Ha azonban a stop után a 3'UTR szokatlanul hosszú (pl. egy korai stop {PTC} miatt), így az eRF3 nem éri el és nem tud kölcsönhatásba lépni a távol lévő PABP-vel, a termináció lelassul, a riboszóma nem tud hatékonyan disszociálni a mRNS-ről. Ezt a hibás, lassú terminációt ebben az esetben a UPF1 NMD faktor oldja fel, azáltal hogy bekötődik a PABP helyett az eRF3-hoz, megjelölve így a stop kodont, mint PTC-t (Áltanos ábra 2B). A UPF1 kiváltja az NMD komplex összeszerelődését a mRNS-en, ami a mRNS degradációjához, ezáltal a riboszóma felszabadulásához vezet. Állatokban a UPF1 foszforegulációs szabályozás alatt áll. Az SMG1 PIKK kináz foszforilálja a UPF1-et és ez a foszforiláció a funkcionális NMD komplex kialakulásának kulcslépése (Yamashita *et al.*, 2005). Élesztőben a UPF1 foszforiláció nem mutatható ki (Shyu *et al.*, 2008). A UPF1 és a PABP tehát versenyeznek az eRF3 kötésért. Ezt a versengést támasztják alá azok az élesztőben, *Drosophilában* és emlősben végzett

kísérletek, ahol a PTC tartalmú, hosszú 3'UTR-al rendelkező mRNS-ek kimenthetők voltak az NMD-ből, ha a PABP-t mesterségesen a 3'UTR-ba, a stop közelébe kötötték, ezáltal lehetővé tették, hogy az eRF3-PABP kapcsolat kialakulhasson (Amrani *et al.*, 2004; Behm-Ansmant *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2008). A hosszú 3'UTR-alapú NMD során az esetek nagy részében tehát a PABP-eRF3 interakció létrejötte vagy elmaradása dönti el, hogy az NMD támadja-e az mRNS-t. Élesztőben azonban a PABP-n kívül más az NMD-t megakadályozó 3'UTR szignált is azonosítottak. Az élesztő ugyanis PABP hiányában is képes elkülöníteni a valódi stop kodont és a PTC-t. Valószínű, hogy az élesztő mRNS-ek 3'UTR-jához a PABP mellett más a terminációt serkentő fehérjék is kötődnek (González *et al.*, 2000).



Általános ábra 2. PTC azonosítása a hosszú 3'UTR-alapú NMD során (Élesztő modell)

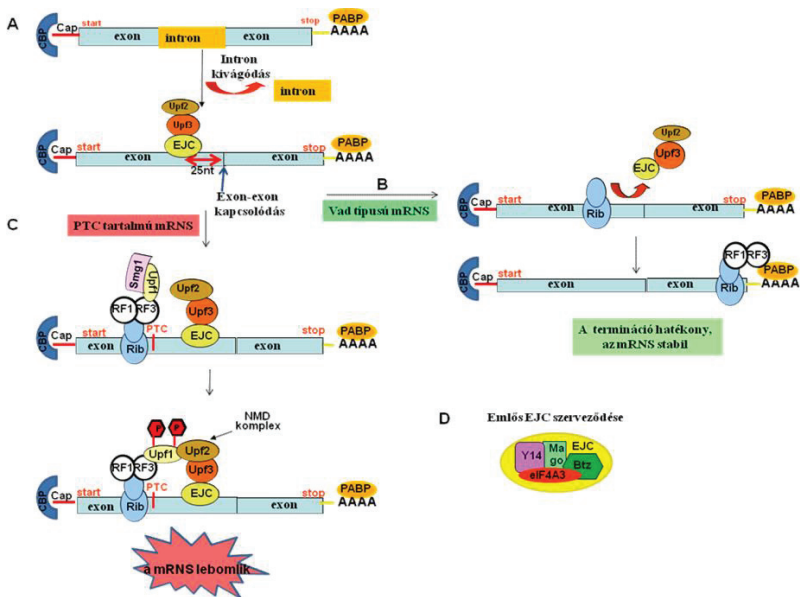
Csoportunk korábban kimutatta, hogy a hosszú 3'UTR-ok növényekben is NMD *cisz* elemként működhetnek. Azt is bizonyították, hogy minél hosszabb a 3'UTR, annál hatékonyabb a mRNS NMD általi degradációja. Azonosították a növényi NMD fő *transz* faktorait, a UPF1, a UPF2, a UPF3 valamint az SMG7 fehérjéket, és igazolták, hogy ezek a fehérjék részt vesznek a hosszú 3'UTR-alapú NMD-ben (Kertész *et al.*, 2006; Kerényi *et al.*, 2008). Azonosítottuk ezen kívül a növényi eRF3 ortológot, és igazoltuk, hogy erősen köti az eRF1-et, de képes kötni a UPF1-et is (Nyikó *et al.*, nem közölt eredmények). Bár a PABP-

eRF3 direkt interakciót növényben egyelőre nem sikerült kimutatni, a PABP mesterséges kötése a 3'UTR-ba a többi eukariótákhoz hasonlóan növényben is képes volt kimenteni az NMD által támadott (NMD target) transzkriptumokat az NMD-ből (Kerényi *et al.*, 2008; Nyikó *et al.*, nem közölt eredmények). Ezek alapján azt gondoljuk, hogy a PTC azonosítás kulcsa növényekben is, akárcsak más eukariótákban, a stop-PABP távolság (Eredmények 5A ábra).

III.3.2. Az intron-alapú NMD rendszer

Bár gerincesekben is megtalálható a hosszú 3'UTR-alapú NMD, itt az intron-alapú NMD útvonal a domináns. Azaz, az NMD itt főként azokat a stop kodonokat ismeri fel PTC-ként, amelyek után a 3'UTR régióban intron(ok) található(ak) (Isken és Maquat, 2007; Daguene *et al.*, 2012). Mivel a gerincesek majdnem minden génje tartalmaz intront, feltételezik, hogy ez segítette elő az intron-alapú NMD ilyen fokú elterjedését ezekben az élőlényekben. A PTC tartalmú mRNS elkülönítése ebben az esetben is a transláció terminációjakor történik. Emlősökben az intron-alapú NMD rendszer kulcseleme az EJC komplex, mely az intron kivágódás során rakódik a mRNS-re. Az EJC kötő felszínként szolgál a UPF3, és ezáltal a UPF2 NMD *transz* faktorok számára (Általános ábra 3A.). Az EJC a sejtmagban kapcsolódik a mRNS-hez, és az mRNS-en is marad, egészen az első translációs körig, amikor a riboszóma eltávolítja a mRNS-ről. A transláció során a riboszóma a mRNS-en haladva leléki az 5'UTR-ban és a kódoló régióban található EJC-eket a mRNS-ről (Általános ábra 3B.). A stopnál elakadó riboszóma eléri és képes lelékni a mRNS-ről a 3'UTR-ban, a stoptól kevesebb, mint 25 nt-ra elhelyezkedő EJC-eket is. Az EJC az intron kivágódás során, az exon-exon kapcsolódás helyétől 20-25 nt-ra az 5'vég irányában rakódik a mRNS-re (Chang *et al.*, 2007), így az intronnak a stoptól legalább 50 nt-ra a 3'vég irányában kell lennie, ahhoz, hogy a stopnál elakadó riboszóma ne tudja lelékni az EJC-et a mRNS-ről. Ilyenkor a mRNS-en maradt EJC köti a UPF3-UPF2 NMD faktorokat, ezáltal felgyorsítja az NMD komplex összeszerelődését. A terminálódó riboszóma eRF3 komponenséhez kapcsolódó UPF1 könnyen kölcsönhatásban lép a 3'UTR-on maradó EJC-UPF3-UPF2 komplex-el, ezáltal kialakul az NMD komplex (Általános ábra 3C.). Ezután a UPF1 foszforilálódik, és kiváltja a mRNS degradációját. Emlősökben a feltételezések szerint a UPF1 könnyen bekapcsolódik a riboszómán lévő eRF3-hoz, azaz az NMD hatékonyságát itt nem az befolyásolja, hogy létrejöhet-e a UPF1-eRF3 kapcsolat. A sebességmegszabó lépés sokkal inkább a UPF1-UPF2-UPF3 kapcsolat kialakulása lehet. Ezt gyorsíthatja fel a 3'UTR-ban található EJC-UPF3-UPF2 komplex, azáltal, hogy növeli a UPF3 és UPF2 koncentrációt

a terminálódó riboszóma környezetében (Kashima *et al.*, 2006). Emlősökben tehát az intronok pozíciófüggő NMD *cis* elemek, csak a 3'UTR-ban, a stop kodontól legalább 50 nt-ra elhelyezkedő intronok indukálnak NMD-t. Az NMD indukciónak kulcsfontosságú eleme az EJC komplex. Az emlős EJC négy fő fehérje alkotója, az Y14, a Mago, a 4A3 és a Barentsz. Az EJC két heterodimerből az Y14-Mago és a 4A3-Barentsz heterodimerből áll össze (Általános ábra 3D.). Az EJC-nek az NMD-én kívül fontos szerepe van többek közt a splicingban, a mRNS exportban és a mRNS citoplazmás lokalizációjának meghatározásában is.



Általános ábra 3. PTC azonosítása az emlős intron-alapú NMD során

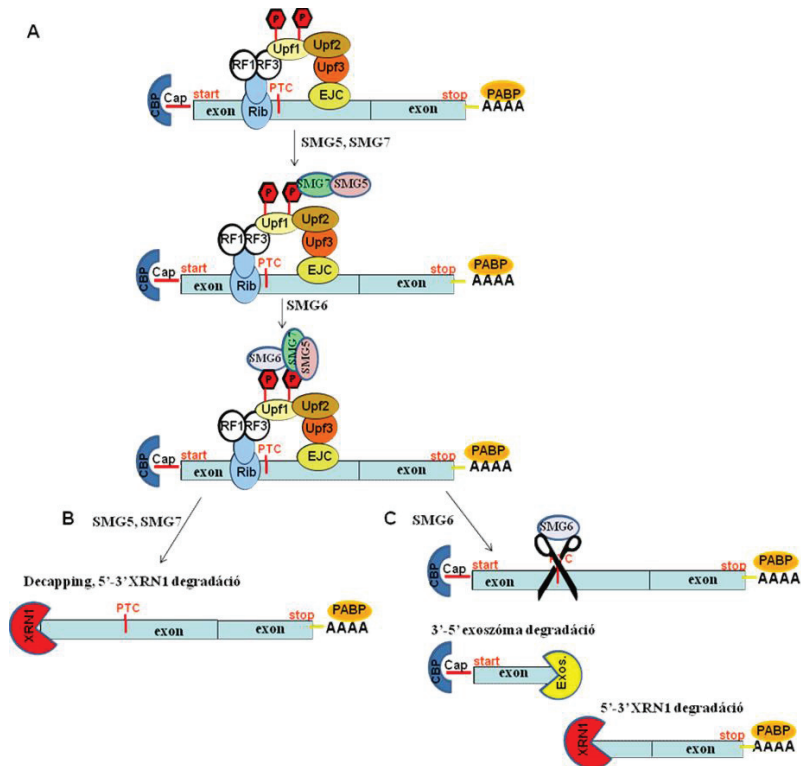
Gerinctelenekben és élesztőben az intronok nem játszanak szerepet az NMD-ben, ezért jó ideig az az elmélet élt, hogy az intron-alapú NMD csak a gerincesekben alakult ki, ahol az intronok nagyon gyakoriak a genomban. Feltételezték, hogy az intron-alapú-NMD az alternatív splicing elterjedésével párhuzamosan alakulhatott ki, és válhatott egyre fontosabbá. Az alternatív splicing révén ugyanis egyre több olyan hibás PTC-t tartalmazó transzkriptum keletkezett, melynek 3'UTR-jában intron volt. Mivel az intron jelenléte a 3'UTR-ban jelentősen felgyorsította a PTC tartalmú mRNS azonosítását, nem véletlen, hogy az intron-

alapú NMD dominánsá válhatott. Az elképzelés logikusnak tűnt, éppen ezért meglepő volt, amikor a csoportunknak sikerült kimutatni, hogy az intron-alapú NMD növényekben is működik (Kerényi *et al.*, 2008). Igazolták, hogy növényekben, akár csak emlősökben, az intronok pozíciófüggő NMD *cis*z elemek, csak azok az intronok képesek NMD-t okozni, amelyek a 3'UTR-ban, a stop kodontól legalább 50nt-ra helyezkednek el. Minél távolabb van egy intron a stoptól, annál erősebben indukálja az NMD-t (Kerényi F. *et al.*, nem közölt eredmények). Sikerült azonosítani az emlős EJC két komponensének, a nagyfokú konzervációt mutató Y14-nek és a Mago-nak a növényi ortológját is. Bizonyították, hogy mindkét fehérje szükséges a növényi intron-alapú NMD-hez, ugyanakkor egyik sem kell a hosszú 3'UTR-alapú NMD-hez. Ezzel szemben a UPF1, a UPF2, és az SMG7 fő NMD faktorok, mind a hosszú 3'UTR-alapú, mind az intron-alapú növényi NMD működéséhez elengedhetetlenül fontosak (Kerényi *et al.*, 2008).

III.4. Az NMD kései szakasza - a PTC-t tartalmazó mRNS lebontása

Míg a PTC felismerése és a UPF1-UPF2-UPF3 NMD komplex összeszerelődése egy viszonylag konzervált folyamat, addig a mRNS degradációja élesztőben, *Drosophilában*, emlősökben és növényekben eltérő módon történik. Élesztőben az NMD komplex kialakulása után a UPF1 elsősorban a mRNS gyors, deadeniláció-független decappingját, majd 5'-3' irányú lebomlását okozza. Bizonyos esetekben azonban felgyorsított deadenilációt követő 3'-5' irányú exoszomális degradáció is előfordulhat (Parker és Song, 2004). *Drosophilában* az NMD komplex összeszerelődése a mRNS SMG6 általi endonukleolitikus vágását okozza, a vágás termékeit az XRN1 és az exoszóma bontja le (Eberle *et al.*, 2009, Huntzinger *et al.*, 2008). Emlősökben az NMD komplex kialakulása után, az SMG1 PIKK kináz foszforilálja a UPF1 N-terminális részén található konzervált treonin (T28), és a C-terminálisán lévő szintén konzervált szerin (S106) aminosavakat. A UPF1 foszfoszerinjéhez bekapcsolódik a 14-3-3 foszfoszerin kötő doménnel rendelkező SMG5-SMG7 heterodimer. Az SMG5-SMG7 elősegíti egy rokon foszfoszerin kötő fehérjének, az SMG6-nak a kötődését a UPF1 N-terminálisán található foszfortreoninhoz (Általános ábra 4A). Ezután legalább két alternatív degradációs útvonal aktiválódhat (Unterholzner és Izaurralde 2004; Yamashita *et al.*, 2005; Katsuhata *et al.*, 2011). Az SMG7 a mRNS DCP2- és XRN1-függő, gyors degradációját idézheti elő. (Általános ábra 4B) (Fukuhara *et al.*, 2005). Az SMG5-SMG7 heterodimer ezenkívül defoszforilálja a UPF1-et, ezzel elérhetővé teszi egy újabb NMD ciklus számára. Egy másik lehetőség, amikor a UPF1 N-terminálisán található foszfortreoninhoz bekötődött SMG6 a cél transzkriptumot a PTC közelében endonukleolitikusan hasítja. Az így keletkezett

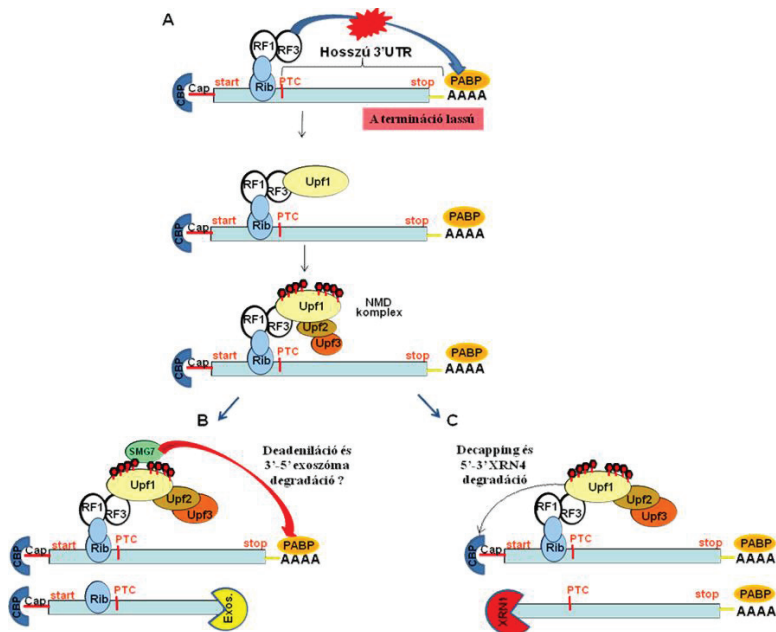
szabad 3'-, illetve 5'-végű vágás termékeket az exoszóma, illetve az XRN1 bontja le (Általános ábra 4C) (Eberle *et al.*, 2009; Orban és Izaurralde, 2006). Azt, hogy mi dönti el, hogy az SMG7 vagy az SMG6 általi degradáció aktiválódjon, egyelőre nem lehet tudni.



Általános ábra 4. Az emlős NMD kései szakasza-az NMD általi mRNS degradáció emlősökben

Bár növényekben a UPF1 foszforilációjáért felelős enzimet eddig nem sikerült azonosítani, igazoltuk, hogy a növényi UPF1 is foszforilált. Az egyelőre nem tisztázott, hogy a UPF1 foszforiláció az NMD komplex összeszerelődése előtt vagy után történik-e. Eredményeink azt mutatják, hogy az emlős UPF1-gyel ellentétben, a növényi UPF1 N- és a C-terminálisán számos foszforilált aminosav található, de az, hogy ezek mind szükségesek-e az NMD aktivitáshoz egyelőre nem tisztázott (Általános ábra 5A). Bizonyítottuk azt is, hogy a növényi SMG7 is tartalmaz egy 14-3-3-szerű domént, és igazoltuk, hogy a 14-3-3 domén

konzervált foszfoszerin kötő aminosavai nélkülözhetetlenek a növényi NMD-hez. Így igen valószínű, hogy az SMG7 növényekben is a 14-3-3 domén segítségével kapcsolódik a foszfo-UPF1-et tartalmazó NMD-komplexhez (Általános ábra 5A). Valószínű, hogy az SMG7 a PTC-tartalmú mRNS gyors deadenilációját indukálja. A deadenilált mRNS-eket feltehetően az exoszóma degradálja. Valószínűleg ez a fő NMD degradációs útvonal (Általános ábra 5B). Eredményeink arra utalnak, hogy egyes esetekben a lebontás SMG7-től függetlenül is végbemehet egy alternatív útvonalon, melyhez nincs szükség SMG7-re, viszont nélkülözhetetlen a UPF1 és az XRN4 5'-3' exonukleáz (Általános ábra 5C). Növényekben az SMG6 endonukleáz nem volt azonosítható és a PTC-tartalmú transzkriptumok endonukleolitikus vágását sem sikerült kimutatni. Feltehetően a növényi NMD rendszer reciklizálásához is fontos lehet az SMG7 UPF1 defoszforiláló szerepe, de ennek direkt bizonyítékát eddig szintén nem sikerült kimutatni (Mériai és Benkovic *et.al.*, 2012).

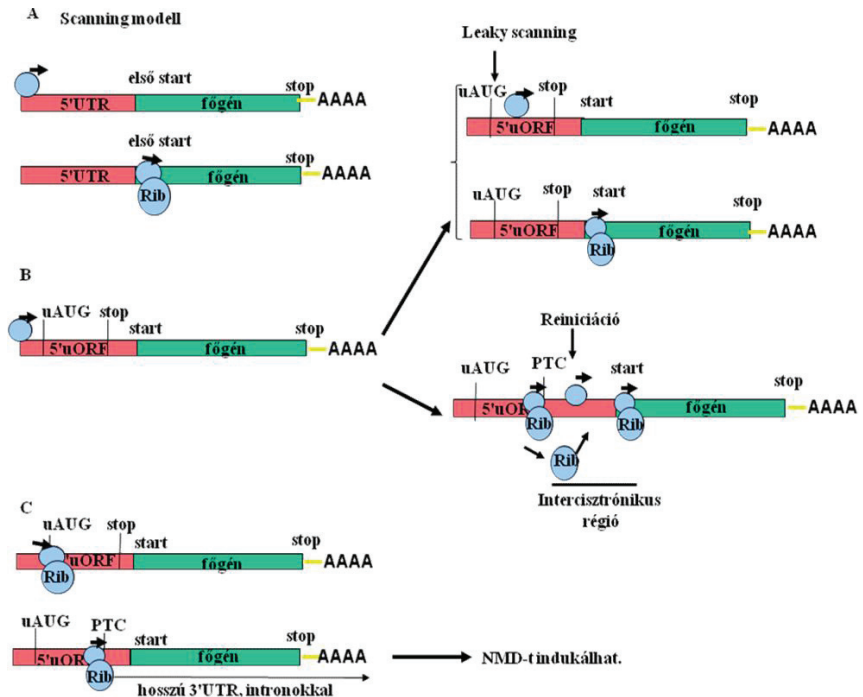


Általános ábra 5. A növényi hosszú 3'UTR-alapú NMD modellje

IV. Az 5'UTR-ban található korai nyílt leolvasási keretek (uORF) hatása a génexpresszióra.

Eukariótákban a transzláció iniciációja során a kis riboszómális alegység a mRNS 5' végéhez kapcsolódik, és addig pásztázza az mRNS-t, amíg talál egy kedvező iniciációs kontextusban lévő AUG (start) kodont (scanning modell). Ez az esetek többségében az első start kodon. Ekkor kapcsolódik hozzá a nagy riboszómális alegység, összeáll a transzláció iniciációs komplex, beépül az első aminosav, és elkezdődik a transzláció elongációs szakasza (Általános ábra 6A). Az eukarióta gének közel 20-30%-ban található egy (vagy több) rövid, nyílt leolvasási keret (upstream ORF, uORF) az 5'UTR régióban (Hayden, és Jorgensen., 2007). Bár az uORF-ok működésének és biológiai szerepének tisztázása még gyerekcipőben jár, számos adat bizonyítja, hogy ezeknek az 5'UTR-ban található *cis* elemeknek is fontos szerepük lehet a poszttranszkripciósz szabályozásban. Az uORF-ot tartalmazó mRNS-(ek)en ugyanis a főgén transzlációja csak akkor történhet meg, ha a riboszóma valamilyen nem ismeri fel az uORF start kodonját (leaky scanning), vagy akkor, ha az uORF transzlációja után a kis riboszómális alegység nem válik le az mRNS-ről hanem újakezdi a pásztázást, majd a főgén startjánál a transzláció újra elindulhat (reiniciáció) (Általános ábra 6B). Mindkét folyamatot számos tényező befolyásolhatja. A leaky scanning hatékonyságát főként az uORF startjának szekvencia környezete szabja meg (Suzuki *et al.*, 2000). A reiniciációs hatékonyságot viszont több tényező is befolyásolhatja, így pl. az uORF kódoló régiójának, illetve az intercisztronikus régióinak (uORF stopja és a főgén startja közti szakasz) a hossza (Kozak, 2001). Élesztőben és emlősökben is rámutattak arra, hogy a hosszabb uORF után kevésbé hatékony a reiniciáció, bár ennek pontos magyarázatát nem tudják (Grant és Hinebush, 1994). Ezzel szemben, minél hosszabb az intercisztronikus régió, annál nagyobb esélye van a riboszómának reiniciálódni a következő start kodonnál (Rajkovitsch *et al.*, 2004; Sachs-Geballe, 2006). Az uORF stop körüli szekvencia környezete szintén befolyásolhatja a reiniciációt, azáltal, hogy a riboszóma mRNS-en maradásának vagy leválásának kedvez (Grant és Hinebush, 1994). Az uORF mint *cis* elem tehát hatással lehet a főgén transzlációjára, általában negatívan szabályozva azt. Emellett emlősökben és növényekben is van rá példa, hogy egyes konzervált uORF-okról termelődő fehérjék funkcionálisan is aktívak lehetnek, így *transz* irányban is képesek visszahatni a főgénre. Szerepük általában a főgén transzlációjának megakadályozása (Iacano *et al.*, 2004). Humán sejtekben például az uORF-ok gyakran gátolják olyan gének transzlációját, melyek fehérje terméke nagy mennyiségben a sejtek elrákosodásához vezetne (Mehta *et al.*, 2006). Az onkogenezis megakadályozásában

betöltött fontos szerepüket jelzi, hogy a humán génnek kb. 30%-a tartalmaz uORF-ot és ezek nagy része (15%-a) onkogénekben, növekedési faktorokban és represszorokban fordul elő (Suzuki *et al.*, 2000). Bár az uORF-ok a növényi génekben is gyakoriak (20-30%), funkciójukról kevés adat áll rendelkezésre. Mivel azonban a konzervált uORF-ok felülreprezentáltak a transzkripciós faktorok, translációban szerepet játszó faktorok és a jelátviteli útvonalak kulcs faktorainak génjeiben, feltételezik, hogy növényekben is fontos biológiai szabályozó szerepük van.



Általános ábra 6. 5'UTR-ban lévő nyílt leolvasási keretek (uORF) hatása a főgén kifejeződésére

Több esetben is sikerült kimutatni, hogy a konzervált növényi uORF-okról keletkező fehérjék képesek megvalósítani a főgén translációjának finomszabályozását. Így például a kolin bioszintézisben szerepet játszó PEAMT gén uORF-ja által kódolt fehérje, a PEAMT autoregulációját valósítja meg azáltal, hogy magas kolin szint esetén képes gátolni a PEAMT translációját (Tabuchi *et al.*, 2006). Bár az uORF-ok translációra kifejtett hatását többen is

vizsgálták, kevésbé ismert, hogy az uORF-ok hogyan hatnak a mRNS stabilitására. Emlősökben néhány esetben rámutattak arra, hogy az uORF-ok képesek NMD általi mRNS destabilizációt okozni, azonban ennek mechanizmusát, illetve biológiai jelentőségét eddig kevésbé tanulmányozták (Mendell *et al.*, 2004). Arra vonatkozóan, hogy növényekben az uORF-ok képesek-e befolyásolni a mRNS stabilitását, a munkánk kezdetén egyetlen adat sem állt rendelkezésünkre. Feltételeztük, hogy amennyiben az uORF transzlálódik, a stop kodonja korai stopnak minősül, hiszen az uORF stop utáni 3'UTR régió mindenképpen hosszú lesz, és igen gyakran intronokat is tartalmazhat (Általános ábra 6C). Növényekben a hosszú 3'UTR és a 3'UTR-ban lévő intronok egyaránt a mRNS NMD általi destabilizációját okozzák (Kerényi *et al.*, 2008). Mivel a növényi gének 20-30%-a tartalmaz uORF-ot (Hayden and Jorgensen, 2007), azt várhatnánk, hogy ezek a gének az NMD célpontok egy harmadik, jelentős csoportját képezhetik. Ennek a felvetésnek azonban ellentmondanak azok az eredmények, melyek szerint az NMD mutáns *Arabidopsis* vonalakban (*upf1-5*, *upf3-1*) a fehérjét kódoló vad gének alig 1-3%-ának emelkedik meg az expressziója (Kurihara *et al.*, 2009). Valószínű tehát, hogy ha az uORF-ok képesek is NMD-t indukálni, annak feltételei szigorúan szabályozva vannak.

V. Az NMD rendszer szabályozása eukariótákban

Az NMD mellett, hogy a mRNS-ek minőségellenőrzését elvégzi, a vad típusú gének jelentős részére is hatással van, így sok gén finomszabályozásában is szerepet játszik. Ezek a gének lehetnek direkt és indirekt NMD targetek. A direkt NMD targetek mRNS-ei NMD *cisz* elemeket hordoznak, így ezek mRNS-eit az NMD közvetlenül támadja. Az indirekt targetek az NMD direkt targetek által szabályozott gének. Eukariótákban kimutatták, hogy számos, a génszabályozásban kulcsfontosságú szerepet játszó gén, így például a splicing apparátus génei, vagy a stresszválaszokban szerepet játszó gének, direkt NMD szabályozás alatt állnak (Saiprasad *et al.*, 2007). Az NMD így indirekt módon hatással van az általuk szabályozott összes génre is. Az NMD aktivitás erős ingadozása a génexpresszióra nézve súlyos következményekkel járna. A túl intenzív NMD számos gén alulműködését eredményezhetné, míg a gyenge NMD sok gén túlexpressziójához, illetve a hibás, PTC-t tartalmazó mRNS-ek transzlációjához vezethetne. Ezért fontos, hogy maga az NMD is folyamatos ellenőrzés alatt legyen, így biztosítva az NMD aktivitás szinten tartását, homeosztázisát. Az NMD stabilitását biztosító legegyszerűbb szabályozási mód az autoreguláció lehet, ahol maguk az NMD *transz* faktorok, vagy legalább egy közülük, NMD szabályozás alatt áll. Gerinctelenekben, emlősökben és növényekben is több közvetett bizonyíték volt arra nézve,

hogy létezhet ilyen NMD autoregulációs ciklus (Mendell *et al.*, 2004; Rehwinkel *et al.*, 2006, Yoine *et al.*, 2006). *Upf1* NMD mutáns *Drosophila* és humán sejtekben ugyanis megfigyelték, hogy az SMG5 és az SMG7 NMD faktorok szintje szignifikánsan megnő (Mendell *et al.*, 2004; Rehwinkel *et al.*, 2006). Hasonlóan, a *upf1-5* NMD mutáns *Arabidopsis*-ban is kimutatható volt az SMG7 mRNS szint megemelkedése (Yoine *et al.*, 2006). Arról azonban, hogy mi az oka az SMG mRNS-ek túlexpressziójának, nem sokat lehetett tudni.

Növényekben sikerült először kísérletesen rámutatni arra, hogy az SMG7 fő NMD faktor maga is direkt NMD szabályozás alatt áll. Csoportunk korábban kimutatta, hogy a növényi SMG7 3'UTR-ja nemcsak szokatlanul hosszú, de tartalmaz 2 intront is. Ha az SMG7 3'UTR-ját a GFP riporter gén stop kodonja mögé klónozták, akkor az a GFP mRNS NMD általi destabilizációját váltotta ki. Azt is megfigyelték, hogy a növényi SMG7 3'UTR-jának szerkezete nagyon konzervált, az összes eddig annotált zárvatermőben hasonló, rendkívül hosszú, és 2 intront is tartalmaz (Kerényi *et al.*, 2008). Ennek alapján feltételezhető, hogy az SMG7 általi NMD autoreguláció növényekben valóban egy biológiailag fontos szabályozási út vonal. Később kiderült, hogy az NMD autoreguláció nem csak növényekben, hanem más eukariótákban is megtalálható. Emlősökben kimutatták, hogy az SMG7 mellett, a fő NMD faktorok, a UPF1, a UPF2, a UPF3, az SMG1, az SMG5 és az SMG6 is mind direkt NMD szabályozás alatt állnak (Huang *et al.*, 2011). Sőt, kiderült, hogy ez az NMD általi autoreguláció sejt- és szövetspecifikus, és a különböző fejlődési stádiumokban is eltérő lehet (Huang *et al.*, 2011). Eredményeik alapján feltételezhető az is, hogy a kívánt NMD aktivitás adott fiziológiai szinten tartása elengedhetetlenül fontos a normális sejt működéshez és a fejlődéséhez. Az emlős NMD tehát nagyon bonyolult, komplex szabályozás alatt áll (Huang *et al.*, 2011). Növényekben egyelőre nincsenek megbízható adatok arra nézve, hogy a különböző környezeti tényezők, illetve az eltérő fejlődési- és stressz állapotok képesek-e befolyásolni az NMD intenzitást. Feltételezzük azonban, hogy az említett tényezőknek hasonlóan az emlősökhöz növényekben is fontos szerepe lehet az NMD szabályozásában.

VI. A növényi NMD vizsgálatára használt tesztrendszerek

A növényi NMD kutatások során alapvetően két vizsgálati rendszert használnak, (1) NMD mutáns *Arabidopsis* vonalak egyedfejlődését, génexpressziós változásait elemzik, illetve (2) tranziens génexpressziós, illetve géninaktivációs tesztekkel tanulmányozzák az NMD mechanizmusát.

Növényekben az egyik legelterjedtebb és leghatékonyabb módszer, a forward, illetve reverse genetikában egyaránt alkalmazott agrobaktérium transzformáción alapuló T-DNS random inszerciós mutagenézis. A beékelődött T-DNS szakasz drámaian csökkenti az inszerció által érintett gén működését, sőt számos esetben teljes génfunkció veszteséhez vezethet. Génexpressziós vizsgálatokkal kimutatható az adott gén funkciója, az általa szabályozott gének, illetve a fenotípusból megállapítható az okozott biokémiai, fiziológiai vagy fejlődési hatás (Winkler és Feldmann, 1998). Ez a módszer, azonban csak *Arabidopsis* esetén alkalmazható sikeresen, nagyszámú mutáns létrehozására (Damian és Ueli, 2002). Mivel a T-DNS inszerció véletlenszerűen történik, ezért a vizsgálni kívánt génre stabil, mutáns homozigóta vonalak azonosítása viszonylag sok munkát és időt igényel. Erre megoldást jelenthet a jóval gyorsabb tranziens génexpressziós rendszerek használata. A növényi NMD rendszer megismerését célzó program megkezdésekor csoportunk egyik fő célja egy hatékony tranziens növényi NMD tesztrendszer kidolgozása volt. A csoport kifejlesztett egy a *Nicotiana benthamiana* (továbbiakban *N. benthamiana*) növények leveleinek agroinfiltrációján alapuló GFP riportert gént felhasználó tranziens NMD tesztrendszert. A rendszer előnye, hogy *N.benthamiana*-ban a teljes levélfelület könnyedén infiltrálható, így mikroszkóp nélkül, szabad szemmel is könnyen és gyorsan (pár nappal az infiltrálást követően) elemezhető, illetve összehasonlítható a különböző riportergének expressziója. Ezzel a tranziens NMD tesztrendszerrel csoportunk azonosította a növényi NMD *cis*z elemeit (Kertész *et al.*, 2006). A tranziens génexpressziós rendszer hátránya, hogy az expresszálni kívánt gén nem épül be stabilan a célnövény genomjába, így csak átmenetileg (néhány napig vagy hétig), és csak az infiltrált célszövetben expresszál. Ezért a tanulmányozott jelenség vizsgálata térben és időben korlátozva van.

A tranziens NMD tesztrendszert a leghatékonyabb növényi géninaktivációs rendszerrel, a Vírus Indukálta Géncsendesítéssel (VIGS-NMD tesztrendszer) kombinálva, sikeresen alkalmaztuk a növényi NMD *transz* elemeinek azonosításához, illetve az NMD mechanizmusának megismeréséhez is (Kerényi *et al.*, 2008). A VIGS-NMD tesztrendszer előnye, hogy megfelelő riportrendszer beállításával sokféle heterológ gén gyors funkcionális tesztelésére felhasználható. Géncsaládok, tandem gének funkciójának vizsgálatára is kitűnően alkalmazható. Hátránya a T-DNS inszerciós mutagenézissel szemben, hogy null-mutációt nem okoz, csak a célgén expresszióját csökkenti. Ha a fennmaradó, csökkent génavaritás is elegendő a funkció betöltéséhez, a valódi hatás nehezen vagy egyáltalán nem vizsgálható. Ez a hátrány azonban előnnyé is válhat, például olyan gének vizsgálatakor, melyek eszenciálisak, így null-mutációjuk letális lenne a növény számára.

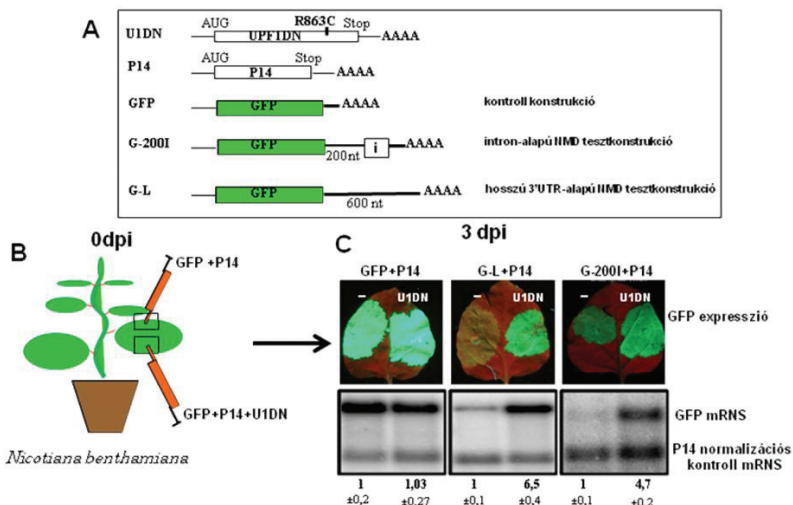
A kísérleteim elvégzéséhez tehát rendelkezésemre állt a csoport által korábban kidolgozott hatékony és gyors tranziens NMD tesztrendszer (U1DN ko-infiltráción alapuló tranziens NMD tesztrendszer (lásd később-VI.1)), illetve a VIGS-el kombinált NMD tesztrendszer (VIGS-NMD tesztrendszer (lásd később-VI.2)), melyek alkalmasak a növényi NMD működési elemeinek, mechanizmusának feltárására. Az alábbiakban ezeket a tesztrendszereket részletesen ismertetem.

VI.1. U1DN ko-infiltráción alapuló tranziens NMD tesztrendszer

A módszer segítségével az agroinfiltrált levélfoltokban az NMD könnyen inaktiválható, így akár egy levélen belül is összevethető a különböző NMD tesztkonstrukciók expressziója NMD hatás alatt, illetve NMD hiányában. Az NMD rendszer tranziens kikapcsolását az infiltrált levélfoltokban úgy valósították meg, hogy a tesztkonstrukcióval együtt infiltrálták (ko-infiltrálták) a UPF1 fő NMD faktor domináns-negatív mutáns változatát (U1DN). A U1DN változatot úgy hozták létre, hogy kicserélték a UPF1 helikáz domén egyik konzervált aminosavát (R863C). Az így mutagenizált UPF1 beépül ugyan az NMD komplexbe, de funkcionálisan inaktív marad, lefagyasztva az NMD komplexet. A U1DN ko-infiltráció hatására az NMD célpont tesztkonstrukciók expressziója és mRNS szintje (a U1DN nélkül infiltrált levélfoltokhoz képest) drámaian megnőtt, azaz a U1DN ko-infiltráció az adott levélrészben valóban az NMD kikapcsolását eredményezte. U1DN ko-infiltráció segítségével tehát könnyen eldönthető, hogy egy adott konstrukció NMD szabályozása alatt áll-e. A módszert a G200I (intron-alapú NMD tesztkonstrukció), G-L (hosszú 3'UTR-alapú NMD tesztkonstrukció) és a GFP NMD által nem befolyásolt kontroll konstrukció segítségével, az alábbiakban részletesen ismertetem.

A G-L hosszú 3'UTR-alapú NMD tesztkonstrukciónál egy intront nem tartalmazó, 600 nt hosszú szekvencia beépítésével meghosszabbítottuk a GFP stop mögötti 3'UTR régiót. A G-L mRNS-ek erős hosszú 3'UTR-alapú NMD választ váltanak ki (Általános ábra 7A). A G200I tesztkonstrukció esetében a GFP stop kodon mögé 200 nukleotidra, egy NMD-t indukáló intront építettünk be, ezért a G200I mRNS-eket az intron-alapú NMD erősen támadja. A GFP kontroll konstrukció mögötti 3'UTR régió rövid és intront sem tartalmaz, így ez a konstrukció nem áll NMD szabályozás alatt.

U1DN ko-infiltráció alapuló transziens NMD tesztrendszer



Általános ábra 7. U1DN ko-infiltráció alapuló transziens NMD tesztrendszer: (A) GFP kontroll konstrukció esetében a GFP stop kodon mögött a 3'UTR rövid és nem tartalmaz intront, így az NMD nem hat rá. A G-200I NMD tesztkonstrukcióban 200 nt-ra a GFP stop kodontól egy NMD releváns intron található, így az intron-alapú NMD hat rá. A G-L NMD tesztkonstrukcióban a GFP stop mögötti 3'UTR régiót 600nt-vel növeltük, így az erős hosszú 3'UTR-alapú NMD célponttá vált. (B) A tesztkonstrukciókat *N. benthamiana* növényekbe infiltráljuk (agroinfiltrálás). A levél egyik oldalára a tesztkonstrukciót és a P14 silencing szuppresszort infiltráljuk. A levél másik oldalára a tesztkonstrukciót és a P14 silencing szuppresszort infiltráljuk. (C) Három nappal az agroinfiltrálás után (3dpi) a GFP expressziót UV fényben vizsgáljuk, míg a GFP mRNA szintet Northern blot segítségével mérjük. A GFP kontroll konstrukcióra nem hat az NMD, ezért a GFP mRNA szint és a GFP fluoreszcencia a levél mindkét oldalán egyformán magas. A hosszú 3'UTR-alapú (G-L) és az intron-alapú (G-200I) NMD tesztkonstrukciók mRNA szintje és zöld fluoreszcenciája gyenge, ugyanis az NMD felismeri és degradálja a róluk képződő mRNA-ket (a levelek és az RNS blottok bal oldala). A U1DN-nel ko-infiltrált levélfoltokban az NMD nem működik, így az NMD tesztkonstrukciók mRNA szintje, ennek következtében pedig a GFP fluoreszcenciája is drámaian megnő (a levelek és az RNS blottok jobb oldala). A blottokat radioaktívan jelölt GFP (különböző GFP-származékok mRNA-eit egyformán kimutatja) és P14 próbákkal hibridizáltuk (a GFP és P14 PCR próbákat a Függelék 1. táblázatban található primerekkel amplifikáltuk). A méréshez normalizációs kontrollként a tesztkonstrukciókkal együtt infiltrált P14 silencing szuppresszor mRNA-t választottuk. A felső számok a U1DN nélküli és a U1DN-val ko-infiltrált mRNA szintek arányát (GFP/P14) mutatják az egyes riportter konstrukciók esetében. A U1DN nélküli mRNA szintet 100%-nak (1) véve adtuk meg. A \pm -al jelölt alsó számsor a szórás értékét adja meg. (A U1DN ko-infiltrációs kísérleteknél mindig ehhez hasonlóan jelölöm az ábrákat a dolgozatban).

A fent bemutatott NMD tesztkonstrukciókat tartalmazó agrobaktérium törzseket *N. benthamiana* növények leveleibe agroinfiltráljuk. A levelek bal oldali felébe a G200I intron-alapú tesztkonstrukciót önmagában infiltráljuk (G200I+P14), míg a jobb oldali felébe ugyanazt a konstrukciót U1DN-nel együtt ko-infiltráljuk (G200I+P14+U1DN) (Általános ábra 7B). Hasonló módon infiltráljuk a G-L hosszú 3'UTR-alapú és a GFP kontroll konstrukciókat is. Mivel az agroinfiltrációval bejuttatott tesztkonstrukciók (transzgének) erős silencing választ váltanak ki a növényben, ezért az infiltrálandó elegyhez minden esetben hozzá kell adni a P14 silencing szupresszort hordozó agrobaktériumot is, így biztosítva, hogy az infiltrált konstrukciók megfelelő szinten kifejeződhessenek (Kertész *et al.*, 2006). A P14-et emellett a Northern blot kísérletek során normalizációs kontrollként is használjuk. 3 nappal az infiltrálást követően (3dpi) UV fényben vizuálisan értékeljük a GFP fluoreszcenciát, majd az infiltrált levélfoltból RNS-t vonunk ki és Northern blottal mérjük a GFP mRNS szintet. Ahogy az várható, a GFP kontroll konstrukció fluoreszcenciája és mRNS szintje egyaránt nagyon erős és nem változik a U1DN ko-infiltráció hatására sem, jelezve, hogy az NMD nincs hatással rá. A GFP kontroll konstrukcióhoz képest a G200I és a G-L NMD célpont tesztkonstrukciók GFP fluoreszcenciája és mRNS szintje jóval gyengébb, viszont drámaian megnő a U1DN-nel infiltrált jobb oldali levélfoltokban. Az NMD tehát mindkét tesztkonstrukciót destabilizálja, így az NMD hiányában (U1DN) nő az expressziójuk. A G-L és G-200I mRNS-ek szintjét a P14 belső kontrollhoz normalizáljuk, így a tesztkonstrukciók mRNS-einek expressziója kvantitatív formában is értékelhető. Eredményeink szerint a G-L, illetve a G-200I transzkriptumok szintje (ebben a kísérletben) a U1DN-nel infiltrált levélfoltokban 6,5-szer, illetve 4,7-szer volt magasabb, mint a vad típusú levélfoltokban (Általános ábra 7C).

A U1DN ko-infiltráción alapuló tranzien NMD tesztrendszer lényege tehát, hogy U1DN ko-infiltrációval az NMD rendszer könnyen inaktíválható, így az NMD tesztkonstrukciókra gyakorolt NMD hatás egyszerűen azonosítható és mérhető. A tesztkonstrukciók NMD érzékenységet a U1DN-val ko-infiltrált, illetve a U1DN nélkül infiltrált minták GFP expressziójának, illetve mRNS szintjeinek összehasonlításával határozzuk meg. Nagy előnye, hogy gyors és kvantitatív vizsgálatokra is alkalmas. Munkám nagy részét ennek a kísérleti rendszernek a felhasználásával végeztem.

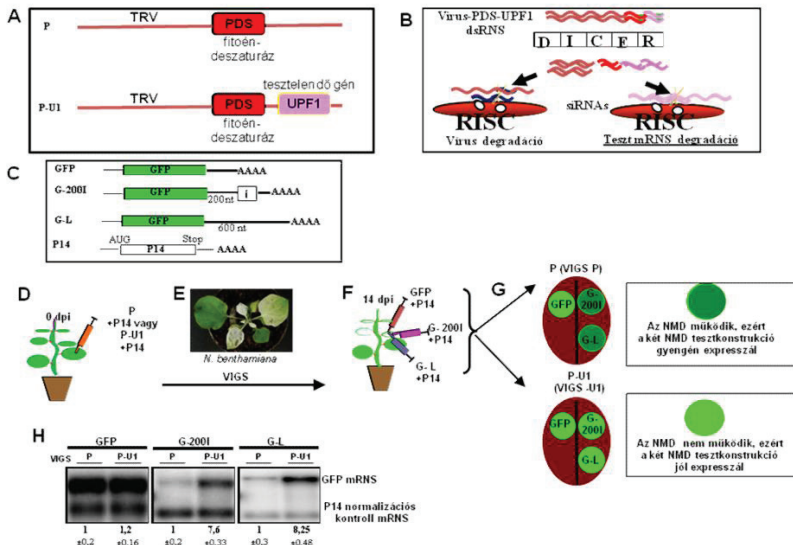
VI.2. VIGS kombinált tranziens NMD tesztrendszer (VIGS-NMD tesztrendszer)

A VIGS-NMD tesztrendszert szintén a munkatársaim dolgozták ki, és a rendszer segítségével sikeresen azonosították a növényi NMD 6 *transz* faktorát (Kerényi *et al.*, 2008). A VIGS-NMD tesztrendszer alapvetően két lépésből áll: 1. A VIGS segítségével kikapcsoljuk a feltételezett NMD *transz* faktort, majd 2. NMD agroinfiltrációs tesztkísérletekkel vizsgáljuk a VIGS-es növények hosszú 3'UTR-alapú, illetve intron-alapú NMD aktivitását.

Első lépésként *Tobacco Rattle vírus* (TRV) VIGS vektorba klónozzuk a csendesíteni kívánt gén (pl. UPF1) és a PDS (phytoene desaturase) gén egy rövid (kb 600-700 nt) szakaszát (TRV-PDS-UPF1) (Általános ábra 8A). A PDS gén a karotin bioszintézisben játszik szerepet, hiányában a növények jól láthatóan kifehérednek (photobleaching), ezért kiválóan alkalmas annak megállapítására, hogy az adott növényben mennyire hatékonyan működik a VIGS. Ezzel szemben a PDS hiánya önmagában nem befolyásolja az NMD működését, ezért a csak PDS-t tartalmazó TRV vektorral (TRV-PDS) fertőzött növények negatív kontrollként használhatóak. (Általános ábra 8A).

A rekombináns vírus vektorokat (pl. TRV-PDS és TRV-PDS-UPF1) *N. benthamiana* növényekbe agroinfiltrálva (Általános ábra 8D) a vírus replikálódni kezd, létrehozva a géncsendesítést kiváltó dupla szálú RNS-t (dsRNS), mely nem csak a vírus géneket, hanem a vírusba beépített csendesíteni kívánt géneket is tartalmazza. Így a növény silencing rendszere nem csak a vírus RNS-eket, hanem a homológ endogén PDS, illetve UPF1 transzkriptumokat is degradálja (Általános ábra 8B). Mivel a vírus szisztemikusan is képes terjedni, 12-14 nap alatt a silencing a növény felső szisztemikus leveleiben is megjelenik. Ennek jól látható jele, hogy ezek a levelek kifehérednek a PDS hiányában (Általános ábra 8E). A TRV-PDS vektorral fertőzött növényekben csak a PDS gén van csendesítve, így az NMD hatékonyan működik. Ezzel szemben, a TRV-PDS-UPF1 vektorral fertőzött növényekben a UPF1 hiánya az NMD aktivitás erős csökkenéséhez vezet (Kerényi *et al.*, 2008).

VIGS-NMD teszrendszer



Általános ábra 8. VIGS -NMD teszrendszer: (A) A VIGS fertőzéshez használt TRV-PDS kontroll-VIGS konstrukció és a TRV-PDS-UPF1 NMD-VIGS konstrukció rajza. (B) VIGS mechanizmusa: vírusfertőzéskor a vírus kétszálú RNS struktúrái indukálják az RNS csendesítést, ami végső soron a vírus RNS-ek és a vírusba beépített PDS és UPF1 szakaszokkal homológiát mutató endogén RNS-ek degradációjához vezet. (C) A kísérletben használt NMD tesztkonstrukciók rajza. (D) *N. benthamiana* növények infiltrálása a VIGS konstrukciókkal. (E) VIGS fertőzés utáni 12-14. napon a PDS csendesítés hatására a növények felső levelei kifehérednek, jelezve, hogy a VIGS működik a növényben. (F) A VIGS tünetei megjelenésekor (12-14dpi) a növény leveleibe foltonként egy-egy NMD tesztkonstrukciót (GFP, G-200I, G-L) infiltrálunk. (G) Három nappal az infiltrálás után UV fényben vizsgáljuk a GFP expressziót. A PDS (P) csendesített kontroll növényekben (TRV-PDS), ahol az NMD zavartalanul működik, az intron-alapú (G-200I) és a hosszú 3'UTR-alapú (G-L) NMD tesztkonstrukciók gyengén expresszálódnak. Azokban a növényekben ahol a PDS mellett a UPF1 is csendesítve van (TRV-PDS-UPF1), az NMD nem vagy csak gyengén működik, ezért mindkét NMD tesztkonstrukció expressziója szignifikánsan megnő. A GFP kontroll konstrukció expresszióját az NMD hiánya nem befolyásolja. (H) A GFP mRNS szinteket Northern blotlal mérjük. A G-200I és a G-L NMD tesztkonstrukciók mRNS szintje 7-8X-ra emelkedik a P-U1 csendesített növényekben, a P csendesített kontroll növényekhez képest. A GFP kontroll konstrukció mRNS szintje, ezzel szemben, a P és P-U1 növényekben hasonló marad. A blotokat radioaktívan jelölt GFP (különböző GFP-szármarazékok mRNS-eit egyformán kimutatja) és P14 próbákkal hibridizáltuk. A méréshez normalizációs kontrollként a tesztkonstrukciókkal együtt infiltrált P14 silencing szupresszor mRNS-ét választottuk. A felső számok a PDS(P) és a U1(UPF1) csendesített növényekből kivont mRNS szintek (GFP/P14) arányát mutatják az egyes repórter konstrukciók esetében. A PDS csendesített kontroll növényekben mért GFP mRNS szintet 100%-nak (1) véve adtuk meg. A \pm -al jelölt alsó számok a szórás értékét adják meg. (A VIGS-NMD teszrendszer használatakor mindig ehhez hasonlóan jelölöm az ábrákat a dolgozatban).

Az így előállított „VIGS-es” növényekbe a már bemutatott módon agroinfiltráljuk GFP alapú kontroll, illetve NMD tesztkonstrukciókat (Általános ábra 8C, F), majd 3 nappal az infiltrálást követően vizsgáljuk a GFP expressziót és mRNS szintet. Az NMD által nem

befolyásolt GFP kontroll konstrukció szintje a TRV-PDS kontroll és a TRV-PDS-UPF1 NMD hiányos tesztnövényekben egyformán magas. Ezzel szemben a G200I intron-alapú, és a G-L hosszú 3'UTR-alapú NMD tesztkonstrukciók expressziója a TRV-PDS-UPF1 növényekben drámaian megnő a TRV-PDS kontroll növényekhez képest, jelezve, hogy a UPF1 hiányában az NMD aktivitás jelentősen legyengült (Általános ábra 8G,H). A VIGS-NMD rendszer alkalmas tehát a növényi NMD-ben szerepet játszó új, még nem ismert *transz* faktorok kimutatására. Munkám során a VIGS-NMD rendszert alkalmaztam a növényi intron-alapú NMD-ben szerepet játszó EJC faktorok azonosítására.

CÉLKITŰZÉSEK

Munkám egyik része az 5' nem transzlálódó régióban (5'UTR) található uORF-oknak, mint új lehetséges NMD *cisz* elemeknek a vizsgálata volt. Feltételeztük ugyanis, hogy ha az uORF-ok transzlálódnak, a 3'UTR-juk feltétlenül hosszú és gyakran intron tartalmú lesz, így erős NMD választ okozhatnak. A növényi gének 20-30%-a tartalmaz uORF-ot (Hayden és Jorgensen, 2007), így azt várhatnánk, hogy ezek az NMD célpontok egy harmadik, jelentős csoportját képezhetik. Ezzel szemben az NMD mutáns *Arabidopsis* vonalakban a vad gének alig 1-3%-ának emelkedik meg az expressziója (Kurihara *et al.*, 2009).

1. Mindezek alapján tisztázni kívántuk, hogy a növényi uORF-ok valóban képesek-e NMD-t okozni, és ha igen, mitől függ, hogy egy uORF NMD-t indukál-e?

Kutatásom másik fő célja a növényi intron-alapú NMD rendszer működési mechanizmusának és szabályozásának vizsgálata volt. Az intron-alapú NMD rendszert korábban kizárólag a gerincesekben mutatták ki. Ennek alapján kidolgoztak egy NMD evolúciós modellt, mely szerint az eukariótákban eredetileg csak az egyszerűbb, hosszú 3'UTR-alapú NMD működött. Ebből alakult ki a gerincesekben egy komplexebb, az intronok pozícióján alapuló NMD rendszer (Rehwinkel *et al.*, 2006; Durand és Lykke-Andersen, 2011). Az, hogy az intron-alapú NMD növényekben is megtalálható, jelentheti azt, hogy az evolúció során egymástól függetlenül a gerincesekben és a növényekben is kialakult egy intronok által szabályozott NMD útvonal. A másik lehetőség, hogy az intron-alapú NMD egy konzervált útvonal, ami már a ma élő eukarióták közös ősében is jelen volt, és később a gerincesekben dominánssá vált. Azt reméltük, hogy ha sikerül feltárni a növényi intron-alapú NMD működését, *cisz* és *transz* elemeit, majd összehasonlítani a gerincesekben működő intron-alapú NMD-vel, akkor közelebb kerülhetünk az eukarióta NMD evolúciójának megértéséhez.

2. Emlősökben az intron-alapú NMD rendszer kulcseleme az EJC, melynek négy fő fehérje alkotója az Y14, a Barentsz, a Mago és a 4A3 (Le Hir *et al.*, 2000; Dagenet *et al.*, 2012). Tisztázni szeretnénk volna, hogy az emlős NMD rendszerhez hasonlóan növényekben is egy EJC függő intron-alapú NMD rendszer működik-e? Elsődleges célunk az EJC-t alkotó fehérje faktorok növényi ortológjainak azonosítása, majd ezek NMD-ben betöltött szerepének tisztázása volt.

3. Emlősökben korábban már azonosították a riboszómához kapcsolt PYM fehérjét, melynek szerepe, hogy a transláció során eltávolítsa az EJC komplexet a mRNS-ről, biztosítva ezáltal a normál mRNS-ek translációját, valamint az EJC reciklizációját (Gehring *et al.*, 2009; Bono és Gehring, 2011). Következő célunk tehát az EJC mRNS-ről való eltávolítását, azaz a folyamat reciklizálását végző növényi fehérje azonosítása és jellemzése volt.

4. Feltételeztük, hogy az NMD intenzitása szigorúan szabályozva van. A legegyszerűbb szabályozási rendszer egy negatív visszacsatolás lenne, amelyben maguk az NMD *transz* faktorok állnak NMD szabályozás alatt. Korábban kimutattuk, hogy a növényi NMD rendszer a mindkét típusú NMD-ben szerepet játszó SMG7 *transz* faktor révén autoregulációs szabályozás alatt áll (Kerényi *et al.*, 2008). Feltételeztük, hogy a két NMD rendszer külön szabályozással is rendelkezhet, ezért célul tűztük ki a növényi intron-alapú NMD rendszer lehetséges szabályozási útvonalainak vizsgálatát.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

I. Felhasznált anyagok

I.1 Növények

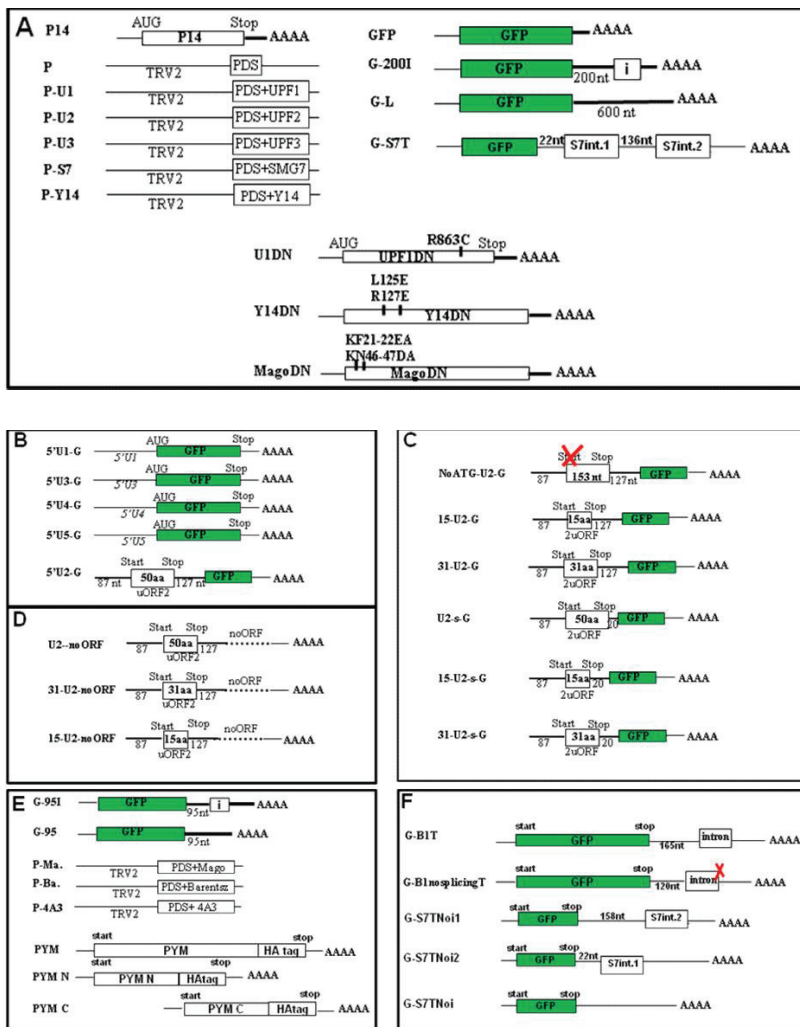
Az agroinfiltráláshoz és VIGS-hez is kb. 3 hetes vad típusú *N. benthamiana* növényeket használtam, amelyeket üvegházi körülmények közt neveltünk. Agroinfiltrálás vagy VIGS fertőzés után a növényeket már kontrolált körülmények közt, 23-25 °C-on, hosszú nappalon (16 óra fény/8óra sötét), növénynevelő kamrában tartottuk. Az endogén Barentsz és SMG7 mRNS szintek qPCR méréséhez *Salk_112922 upf1-5* és *Salk_025175 upf3-1* T-DNS mutáns *Arabidopsis* vonalakat használtuk.

I.2. Agrobaktérium törzs

Agroinfiltráláshoz az *E. coli*ban módosított kanamicin rezisztens bináris vektorokat háromszülős keresztezéssel (triparental mating) *Agrobacterium tumefaciens* rifampicin és tetraciklin rezisztens C58C1 törzsébe konjugáltuk. A harmadik szülő az *E. coli* pRK Helper plazmidot hordozó kanamicin rezisztens törzse volt.

I.3. Expressziós vektorok és NMD tesztkonstrukciók

A klónozásokat az *E. coli* DH5 α törzsében végeztük. A vizsgálandó géneket az agroinfiltrálásra alkalmas pBin61S bináris vektorba vagy annak egy HA-tag-el rendelkező módosított változatába (BinHASanyi), a 35S promotor és 35S terminátor régió közt elhelyezkedő klónozó régióba építettük be (Silhavy *et al.*, 2002). A BinP14 (P14) a TRV-PDS, TRV-PDS-UPF1, TRV-PDS-UPF2, TRV-PDS-UPF3, TRV-PDS-SMG7, TRV-PDS-Y14 vektorok, a BinU1DN (U1DN) BinY14DN (Y14DN), BinMagoDN (MDN) NMD konstrukciók valamint a BinGFP (GFP), BinGFP-L (G-L), BinGFP200I (G-200I) és a BinG-S7T (G-S7T) riporterek klónozását munkatársaim már korábban leírták (Kertész *et al.*, 2006; Kerényi *et al.*, 2008) (Általános ábra 9A).



Általános ábra 9. A dolgozatban használt összes konstrukció rajza. (A) A korábban már publikált konstrukciók rajza. (B), (C), (D), (E), (F) A dolgozatban használt további konstrukciók rajza (a függelékben található részletes klónozási leírásnak megfelelő sorrendben).

A további felhasznált tesztkonstrukciók (Általános ábra 9B,C,D,E,F) klónozásának részletes leírása és a klónozáshoz használt DNS oligonukleotidok listája a dolgozat függelékében megtalálható (Függelék 1.táblázat).

II. Felhasznált módszerek

II.1. RT-PCR (reverz transzkripció)

100 mg levélszövetből EZ-10 Spin Column Total RNA Minipreps Super kittel RNS-t vontunk ki. A gyártó utasítása szerint 1-2 µg RNS-t DNázal (Fermentas) kezeltünk, majd fenol-kloroform extrakcióval tisztítottuk (200µl DNáz kezelt mintához 100µl fenol és 100µl kloroformot adtunk, alaposan összekevertük, centrifugáltuk 5 percig 13.000 rpm-en, 200 µl felülúszót leszívunk). A felülúszót 0,3M Na-acetáttal és abszolút alkohollal -20°C-on egy éjszakán át kicsaptuk. Másnap 15 percig 4°C-on centrifugáltuk, majd a pelletet 1ml 70%-os alkohollal mostuk. Beszáritás után 20µl steril desztillált vízben visszaoldottuk. Az így kapott RNS minta tisztaságáról (DNS mentességéről) reverz transzkripció ciklus nélküli PCR-rel bizonyosodtunk meg. A reverz transzkripciókhoz minden esetben a RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kitet (Fermentas) használtunk, követve a gyártó által megadott használati utasítást. Kvantitatív PCR-hez (qPCR) mindig random hexamer oligóval készült a cDNS templát, míg a szemi-quantitatív mérésekhez (PCR) készülő cDNS könyvtárakat oligodT primerrel hoztuk létre. Az elkészült cDNS reakciót, további tisztítás és hígítás nélkül használtuk a PCR reakcióhoz illetve a qPCR mérésekhez. Az RT-PCR-ekhez illetve qPCR-ekhez használt DNS oligók pontos szekvenciáját a függelékben megtalálható (1. és 2. táblázat).

II.2. PCR-mutagenézis

A PCR mutagenézist a „linker scanning mutagenézis” technikával készítettük (Sambrook és Russell, 2001). A mutagenizálni kívánt DNS szekvencia két végére egy-egy teljesen komplementer forward (F) és reverz (R) primert terveztünk. A tervezett mutáció szekvenciakörnyezetére a mutációt hordozó, de egyébként teljesen komplementer forward (mutF) és reverse (mutR) egymással átfedő primereket terveztünk. Az eredeti (nem mutáns) DNS szekvenciát használva templátként az F/mutR és mutF/R primerpárokkal két részleges, egymással átfedő PCR fragmentet készítettünk. Mindkét fragment hordozta a mutációt, és kb. 15 bp átfedő régiót tartalmaztak, így a két fragmentet primerek nélküli, „primer extenziós” módszerrel 15 ciklusos PCR reakcióban egyesítettük, majd a szélső, forward (F) és reverse

(R) primerekkel 40 ciklusos PCR reakcióban felszorzósítottuk a teljes hosszúságú, de a mutációt már hordozó fragmentet.

II.3. Agroinfiltrálás

A vizsgálni kívánt konstrukciókat tartalmazó Agrobaktériumokat 5ml folyékony, szelektív táptalajba (LB-25µg/ml kanamicin, 5µg/ml tetraciklin, 10mM MES és 20µM acetosziringon) oltottuk le, és egy éjszakán át 28-30°C-on növesztettük. Másnap centrifugáltuk (Rotor-Sorvall SA 600, 3000g) a baktériumokat, majd a felülúszó leöntése után a baktérium pelletet, a fertőzőképességet növelő acetosziringont tartalmazó *Agrobaktérium* visszaoldó folyadékban (10 mM MgCl₂, 10 mM MES és 150 µM acetosziringon) szuszpendáltuk. Spektrofotométerrel megmértük a baktérium kultúrák optikai denzitását (OD₆₀₀), majd *Agrobaktérium* visszaoldó folyadékkal a kívánt koncentrációra hígítottuk (úgy, hogy a végkoncentráció a P14-re mindig OD₆₀₀ 0,2, minden más konstrukcióra OD₆₀₀ 0,4 legyen). Infiltrálás előtt, szobahőmérsékleten 3 órát állni hagytuk. Az együtt infiltrálandó konstrukciókat egy elegybe kevertük össze infiltrálás előtt és mindig hozzáadtuk az elegyhez a P14 kultúrát is (pl.U1DN+G-L+P14). Korábban ugyanis a csoport kimutatta, hogy a P14 jelentősen képes csökkenteni a transzgén indukálta RNS csendesítést. Az elegyeket 3-4 hetes *N. benthamiana* növények felsőbb, fiatal leveleibe (2 levél növényenként) a levél fonákon, a gázcserenyílásokon keresztül, 1 ml-es fecskendővel juttattuk be. Az infiltrált növényeket 23-25°C-on, hosszú nappalon, növénynevelő kamrában neveltük tovább, majd 3 nappal az infiltrálást követően (3dpi) az infiltrált levél foltból RNS-t vontunk ki. Abban az esetben, ha az infiltrált konstrukció(k) GFP riporter gént is tartalmaztak a leveleket UV fényben is megvizsgáltuk és lefotóztuk. A vizuális értékeléshez és a fotózáshoz kézi UV lámpát (100W-Upland, CA 91786, Black Ray model B 100AP) és Nikon D-200 digitális fényképezőgépet (sárga UV szűrővel) használtunk.

II.4. Vírus indukálta géncsendesítés (VIGS)

A VIGS fertőzéshez 3 hetes *N. benthamiana* növények alsóbb leveleit (2 levél növényenként), három agrobaktérium kultúrát tartalmazó elegyvel a fent ismertetett módon infiltráltuk. Az elegy két komponense a P14-et és a TRV-RNA1 (Bintra6 - Ratcliff *et al.*, 2001) vektort tartalmazó Agrobaktérium mindig állandó. A harmadik komponens a TRV2-PDS vektor a csendesítendő génünk egy részét tartalmazza. A fertőzött növényeket 23-25°C-on, hosszú nappalon tartottuk, majd kb 12-14 nappal a VIGS indítását követően, mikor a növényeknek az újonnan növő levelei a PDS csendesítés hatására már jól láthatóan kifehéredtek, jelezve, hogy a géncsendesítés jól működik, felülinfiltráltuk a vizsgálandó tesztkonstrukció(k)-al. 3 nappal

az infiltrálást követően a növényeket UV fényben vizuálisan értékeltük, majd az infiltrált levélfoltokból RNS-t vontunk ki.

II.5. RNS kivonás növényi szövetből

Az RNS kivonáshoz kétféle módszert alkalmaztunk. Az RT-PCR reakciókhoz EZ-10 Spin Column Total RNA Minipreps Super kisset használtunk a kivonáshoz, követve a gyártó által megadott utasításokat. A Northern blot analízishez a kevésbé tisztább, de jóval olcsóbb totál nukleinsav kivonást, a White és Kaper féle módosított módszert használtuk (White és Kaper, 1989). Az infiltrált levélfoltokból frissen kivágott, azonos mennyiségű (kb.100mg) levéldarabokat folyékony nitrogénben homogenizáltunk. A nitrogén elpárolgása után a mintákat nagyon gyorsan 700 µl kivonó pufferben (0,1 M glicin, 10 mM EDTA, 0,1 M NaCl) és 600 µl fenolban elkevertük. Fontos a gyorsaság, mivel ennél a lépésnél nagyon könnyen lebomolhat az RNS a feltárt mintában, ha a fenolt nem adjuk hozzá időben. Alapos vortex-et követően 15.000 rpm-en 5 percig centrifugáltuk, majd a felső vizes fázishoz (kb 600 µl) 250 µl fenolt és 250 µl kloroformot mértünk, összekevertük és újra centrifugáltuk 15.000 rpm-en 5 percig. Az így kapott 400 µl vizes fázist 1ml abszolút alkohollal és 44 µl 3M-os Na-acetáttal 15 percig jégen tárolva kicsaptuk. Kicsapás után 15 percig 4°C-on, 15.000 rpm-en centrifugáltuk, majd a pelletet 1ml 70%-os alkohollal mostuk, beszárítottuk, és 50µl steril desztillált vízben visszaoldottuk.

II.6. Northern blot

Az RNS-ek koncentrációját spektrofotometriás módszerrel (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer) megmértük és 2 µg RNS-t vákuum szárítóban beszárítottunk, majd RNS mintafelvívó pufferben visszaoldottuk és 10 percig 65°C-on denaturáltuk. Az így előkészített mintákat denaturáló agaróz gélben futtattuk (1xMAE, 0,008% formaldehid, 1,5%agaróz gél) és kapilláris blottolással nitrocellulóz membránra (Hybond-N GE Healthcare, Amersham Bioscience) blottoltuk. A blottolás egy éjszakán át tartott és 20x SSC oldatot használtunk hozzá. Hibridizálás előtt az RNS-eket UV keresztkötéssel a membránhoz rögzítettük. A hibridizáláshoz a próbát, Hexalabel kittel (Fermentas), α -³²P izotóp (dCTP-0,74 MBq, Izotóp Int. Kft.) felhasználásával PCR templátról (P14(500)-GFP(700nt)) készítettük. A membránt Church pufferben (0,5M NaPi, 7% SDS, 1mM EDTA pH 8,0, 1%BSA, 0,02 mg/ml ssDNS(próba)) 65 °C-on, egy éjszakán át hibridizáltuk. Másnap a membránokat 2xSSC, 0,1% SDS oldatban mostuk kétszer 15 percig, 65 °C-on. A radioaktív jelet az Amersham

Biosciences gyártó Storm 840 szkennerével detektáltuk, és ImageQuant szoftverrel értékeltük. A GFP jeleket mindig a P14 jelle normalizáltuk.

II.7. Kvantitatív PCR (qPCR)

A kvantitatív mérésekhez az RNS-eket EZ-10 Spin Column Total RNA Minipreps Super kittel vontuk ki, majd DNázissal kezeltük és fenol-kloroformos tisztítás (lásd II.1) után RevertAid™ First strand cDNA Synthesis kittel (Fermentas) cDNS első szálát írtunk róla. Az reverz transzkripcióhoz a kit random hexamer primerét használtuk. Az így készült cDNS reakciót további tisztítás nélkül használtuk a qPCR-hez, melyet a SensiFAST™ SYBR No-ROX One-Step Kittel (Bioline) végeztünk (Rotor-Gene (RG-3000) R Corbett Research). A kiértékelésnél a „Delta Delta CT” értéket vettük számításba. Normalizációs kontrollként az *Arabidopsis* ubiquitin (At1G01660) gént használtuk. A qPCR-ekhez használt DNS oligók pontos szekvenciája a függelékben megtalálható (2. táblázat).

II.8. Fehérje kivonás növényi szövetből

Az infiltrált levélfoltból frissen kivágott, kb 100 mg-nyi levéldarabokat dörzsmozsárban folyékony nitrogénnel eldörzsöltük, majd három térfogatnyi (X gramhoz 3Xml) jéghideg feltáró puffert (25mM Tris puffer (pH 7,6), 150mM NaCl, 10% glicerol, 2%PVPP, 0,15% Igepál, 5mM DTT, 1% Sigma Plant Protease Inhibitor Cocktail) adtunk hozzá és elkevertük. Az így kapott mintákhoz 1:1 arányban 2XLaemmli oldatot (4%SDS, 20% glicerol, 10% 2-merkaptotanol, 0,004% brómfenolkék, 0,125M Tris HCl) adtunk, 5 percig forraltuk, majd 5 perc centrifugálás (4°C-on, 15.000rpm-en) után a felülúszót új eppendorfba pipettáztuk és további felhasználásig -70°C-on tároltuk.

II.9. Western blot

Az infiltrált génkonstrukciók kifejeződését Western blottal ellenőriztük. A fehérje mintákat SDS poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) elválasztottuk (Sambrook és Russell, 2001), majd 20% metanolt tartalmazó Tris-glicin pufferben (WTB puffer) nitrocelulóz membránra (Hybond-C, 45 mikron, GE Healthcare, Amersham Bioscience) elektroblottoltuk (Fastblot B33electro-blotting apparatus, Biometra, Kvalitex Kft./Ltd.). Ezután a membránt 1 óráig zsírmentes tejpor oldatban (5% tejpor, 1x PBST) blokkoltuk. Blokkolás után a membránt monoklonális, torna-peroxidáz (HRP) enzimmel konjugált HA specifikus ellenanyag (anti-HA peroxidase, Roche) oldatában 1 órán át inkubáltuk. Így szelektíven megjelöltük a HA epitóppal ellátott, kimutatandó fehérjét. Jelölés után a membránt 1x PBST oldatban 4X10

percig mostuk. A kemilumineszcens jelek detektálását ECL+ (ECL+ Western Blotting Reagent, GE Healthcare, Amersham Bioscience) kittel végeztük.

II. 10. Szekvenciakeresések

Az SMG7 illetve a Barentsz különböző növényekben megtalálható homológjait a Phytozome, illetve az NCBI GenBank adatbázisában kerestük (www.phytozome.org; www.ncbi.nlm.nih.gov) a tblastn programmal, az *Arabidopsis* SMG7 (At5g19400), illetve az *Arabidopsis* Barentsz (At1G8000) fehérjéjét használva keresőszekvenciának.

Az *N. benthamiana* EJC alkotók (Y14, Mago, eIF4AIII, Barentsz) és a PYM homológokat a Sol genomics Network (<http://solgenomics.net>), illetve TIGR Plant Transcript Assemblies (<http://plantta.jcvi.org>) adatbázisokban található EST adatok felhasználásával azonosítottuk *Arabidopsis* fehérjeszekvenciákat használva keresőszekvenciának (Hangyáné Benkovics Anna munkája).

EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

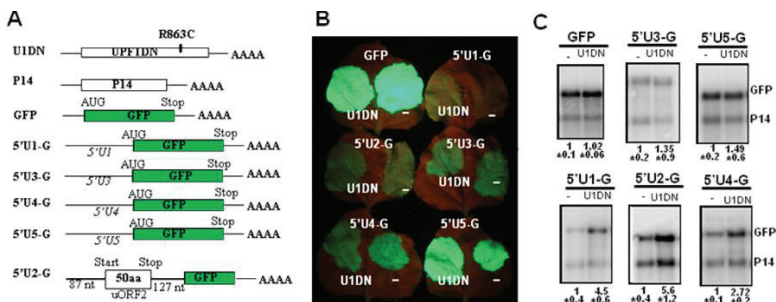
I. Az uORF mint új NMD *cis*z elem a növényekben

Bár az uORF-ok translációra kifejtett hatását többen is vizsgálták, kevésbé ismert, hogy hogyan hatnak az uORF-ok a mRNS stabilitására. Növényekben erre vonatkozóan egyetlen adat sem állt rendelkezésünkre a munkánk kezdetén. Feltételeztük, hogy az uORF translációja, amellettt hogy csökkenti a főgén translációs hatékonyságát, a mRNS destabilizációját is okozhatja. Ha ugyanis ezek az uORF-ok translálódnak, a stop kodonjuk utáni teljes mRNS régió a 3'UTR része lesz. Azaz a 3'UTR feltétlenül hosszú lesz (és nagy valószínűséggel intronokat is tartalmaz), ezért erős NMD választ okozhat (Általános ábra 6C). Mivel a növényi gének 20-30%-a tartalmaz uORF-ot (Hayden és Jorgensen, 2007), azt várhatnánk, hogy a növényi gének jelentős része NMD célpont lesz. Ezzel ellentétben az NMD mutáns *Arabidopsis* vonalakban a vad gének alig 1-3%-ának emelkedik meg az expressziója (Kurihara *et al.*, 2009). Hogy ezt a látszólagos ellentmondást tisztázzuk, megvizsgáltuk, hogy a növényi uORF-ok valóban képesek-e NMD-t indukálni, és ha igen, akkor mi ennek a feltétele.

Név	Funkció	uORF jellemzői
1, At3g53400	nem ismert	1 konzervált uORF 38As hosszú (190-306ig vagy 202-306ig)
2, At1g70780	nem ismert	1 konzervált uORF 50As hosszú (135-287ig)
3, At1g01060	AtLYH- cirkadián ciklusban van szerepe	1 uORF 29As max. (bonyolult 5'UTR szerkezet- sok splice variánsa lehet)
4, At3g08730	AtS6k-riboszómális fehérjék translációs szabályozása	2 lehetséges uORF 31, illetve 41As hosszú
5, At3g1800	PEAMT- kolin bioszintézis	1 konzervált uORF 29As hosszú (72-149ig)

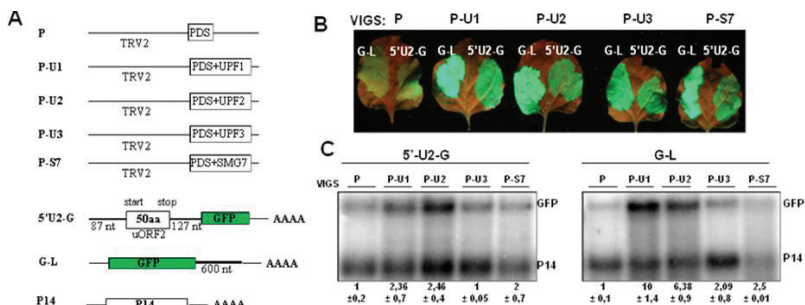
Táblázat 1: Az általunk vizsgált uORF-okat tartalmazó *Arabidopsis* gének funkciója és a uORF-ok jellemzői.

A kísérletekhez kiválasztottunk 5 olyan *Arabidopsis* gént (At3g53400 (továbbiakban 5'-U1), At1g70780 (5'-U2), At3g10060 (5'-U3), At1g08730 (5'-U4), At3g18000 (5'-U5)), amelyek 5'UTR-jában egy vagy több uORF található, és amelyeknek NMD mutáns *Arabidopsis* vonalakban megnőtt a szintje (Kurihara *et al.*, 2009). A gének funkciójáról semmit nem tudtunk, azért lettek kiválasztva, mert feltételeztük, hogy ezekben a génekben az uORF okozhat NMD-t. Mivel az 5'-U1, 5'-U2, 5'-U5 uORF-ok egy- és kétszikűekben nagyfokú konzervációt mutatnak, feltételezhető, hogy ezek transzlálódnak és biológiai funkcióval is rendelkeznek. Nem tudjuk viszont, hogy az 5'-U3, 5'-U4 uORF-ok transzlálódnak-e, és ha igen rendelkeznek-e bármilyen funkcióval (Táblázat 1.). Az említett uORF-kat tartalmazó gének 5'UTR régióit egyenként bináris vektorba, GFP riporter gén start kodonja elé klónoztuk. Kontrollként egy olyan GFP riportert használtunk, melynek 5'UTR régiója nem tartalmazott uORF-ot (Eredmények 1A ábra). Az így kapott riporter konstrukciók (GFP, 5'-U1-G, 5'-U2-G, 5'-U3-G, 5'-U4-G, 5'-U5-G) NMD érzékenységet *N. benthamiana* növényekben U1DN ko-infiltrációs kísérlettel vizsgáltuk. Az infiltrálást követő 3. napon a GFP expressziót UV-fényben értékeltük, illetve RNS mintákat gyűjtöttünk, és Northern hibridizációval ellenőriztük a GFP mRNS szinteket. Feltételeztük, hogy ha az uORF jelenléte az 5'UTR-ban képes NMD-t kiváltani, akkor az uORF-ot tartalmazó riporter konstrukciók GFP expressziója, illetve mRNS szintje is alacsony lesz. Ugyanakkor, ha U1DN ko-infiltrációval kikapcsoljuk az NMD-t, a riportergén szintje újra megnő. Ahogy vártuk, a GFP kontrollal infiltrált levélfolt UV fényben erős expressziót (fluoreszcenciát) mutatott, ami U1DN-nel nem erősödött tovább. Ezzel szemben, az 5'-U5-G-t kivéve, az uORF-ot tartalmazó GFP konstrukciók (5'-U1-G, 5'-U2-G, 5'-U3-G, 5'-U4-G) esetében a fluoreszcencia lényegesen lecsökkent a GFP kontrollhoz képest (Eredmények 1B ábra). Az uORF jelenléte az 5'UTR-ban tehát csökkenti a főgén, esetünkben a GFP expresszióját. Vajon ez az expresszió csökkenés annak köszönhető-e, hogy csökken a GFP mRNS szint? Megvizsgálva a GFP mRNS szinteket is, azt találtuk, hogy három riporter konstrukció, az 5'-U1-G, az 5'-U2-G és az 5'-U4-G esetében -a vad típusú levélfoltokhoz képest- a U1DN ko-infiltrált levélfoltokban szignifikánsan megnőtt a GFP mRNS szintje (Eredmények 1C ábra). Ez azt sugallja, hogy ez a három uORF (legalább részben) azáltal csökkenti a GFP expressziót, hogy hatékony NMD választ vált ki. Mindezek alapján arra következtethetünk, hogy a növényi uORF-ok, bár nem minden esetben, de képesek NMD-t indukálni, és ezáltal szabályozni a főgén expresszióját.



Eredmények 1. Ábra: Az uORF, mint mRNA destabilizáló elem növényekben. A P14-et minden esetben hozzáadtuk az infiltrálandó elegyekhez, de az egyszerűség kedvéért, a továbbiakban ezt nem tüntetjük fel. **(A)** A kísérletben használt konstrukciók nem részletes rajza (kivéve az 5'-U2-G). **(B)** Az infiltrált levelek jobb oldala: a kontroll GFP hatékonyan expresszál. Az 5'U5-G-t kivéve, az összes többi esetben (5'U1-G, 5'U2-G, 5'U3-G, 5'U4-G) az uORF jelenléte a GFP expresszió drámai csökkenéséhez vezetett. **(C)** NMD hiányában (U1DN) az 5'U1-G, 5'U2-G és 5'U4-G tesztkonstrukciók mRNA szintje jelentősen megnő. Az 5'U3-G, 5'U5-G tesztkonstrukciókra és a GFP kontroll konstrukcióra nem hat az NMD. A mRNA szinteket a 7. Általános ábrán leírtak szerint kvantifikáltuk.

Az 5'U2-G riporter tűnt a legerősebb NMD célpontnak. Ráadásul ez rendelkezett a legegyszerűbb, jól átlátható szerkezettel (egyetlen uORF {2uORF} az 5'UTR-ban), ezért a további kísérleteinkhez ezt a konstrukciót, illetve ennek módosított változatait használtuk. Mivel a UPF1 NMD faktor más RNS-degradációs folyamatokban is szerepet játszik (pl. RNS-csendesítés) (Agrica-Reyes *et al.*, 2006), ezért fontosnak láttuk bizonyítani, hogy a mi esetünkben az uORF valóban az NMD által szabályozza a mRNA szintet és nem más, a UPF1-hez köthető degradációs folyamat által. Ha az uORF valóban NMD-t okoz, akkor az 5'U2-G riporter konstrukciónk mRNA szintje nem csak a UPF1, hanem a többi NMD faktor hiányában is állandó marad. Hogy ezt megvizsgáljuk VIGS-el külön-külön csendesítettük a UPF1, a UPF2, a UPF3, és az SMG7 fő NMD faktorokat *N. benthamiana* növényekben (Eredmények 2A ábra). 10-14 nappal a fertőzés után felülínfiltráltuk őket a kérdéses 5'U2-G riporterrel, illetve a G-L hosszú 3'UTR-alapú NMD tesztkonstrukcióval. Ha az uORF valóban NMD-t indukál, akkor az 5'U2-G riporter szintnek nem csak a UPF1, hanem a többi NMD faktor (UPF2, UPF3, SMG7) hiányában is növekednie kell. Az UPF3-at kivéve az 5'U2-G expressziója és mRNA szintje az összes NMD faktor hiányában jelentősen megnövekedett (Eredmények 2 B,C ábra). Bár az 5'U2-G gyengébb NMD célpont, mint a G-L hosszú 3'UTR alapú NMD tesztkonstrukció (Eredmények 2 C ábra).

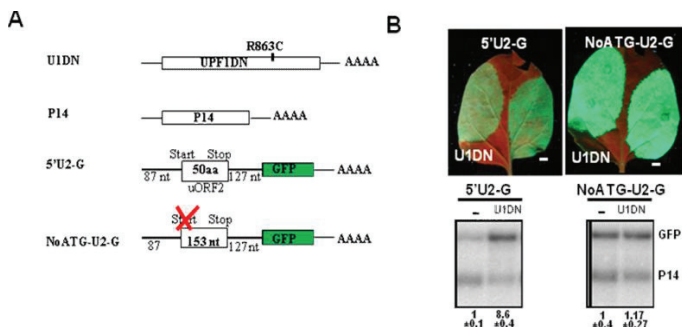


Eredmények 2. Ábra: Az uORF, mint új NMD cisz elem a növényekben. (A) A kísérletben használt konstrukciók nem részletes rajza. (B) A PDS csendesített kontroll növényhez képest, a fő NMD faktorokra csendesített UPF1, UPF2, UPF3 és SMG7 VIGS-es növényekben a G-L hosszú 3'UTR-alapú NMD teszt konstrukció és az 5'U2-G uORF-alapú teszt konstrukció expressziója is megnő. (C) A G-L hosszú 3'UTR-alapú NMD teszt konstrukció mRNS szintje az összes NMD faktor hiányában stabilizálódik, jelezve hogy ezekben a növényekben az NMD nem vagy csak gyengén működik. Az 5'-U2-G riporter mRNS szintje UPF1, UPF2, SMG7 faktorok hiányában megnő, de a UPF3 csendesített növényekben nem változik. A mRNS szinteket a 8. Általános ábrán leírtak szerint kvantifikáltuk.

Ez bizonyítja, hogy az uORF valóban NMD-t indukál. Mivel korábbi és jelen eredményeink is azt mutatják, hogy UPF3 hiányában a G-L, illetve a G200I erős NMD célpont konstrukciók szintje is csak mérsékelten nő, feltételezhető, hogy az NMD a VIGS csendesítés után fennmaradó alacsony UPF3 szintnél is jól működik. Másik lehetőség, hogy a UPF3 csendesítése kevésbé hatékony. Irodalmi adatok alapján a *upf3-1* null-mutáns *Arabidopsis* növényekben (*Salk_025175-upf3-1*) egyes NMD célpont transzkriptumok szintje csak kicsit nő, vagy egyáltalán nem változik (Hori és Watanabe, 2005). Feltételezhető ezek alapján, hogy a UPF3 nem minden esetben kell az NMD degradációhoz növényben. Ezzel összhangban emlősökben is azonosítottak olyan NMD target mRNS-eket, melyeket az NMD bont le, de ehhez nincs szükség a UPF3-ra (Chan *et al.*, 2009). Ugyanakkor erről a UPF3-független NMD útvonalról egyelőre semmit sem tudunk. A növényi UPF3 szerepének tisztázásához további kísérletek folynak, jelenleg a *upf3-1* null-mutáns *Arabidopsis* ok protoplasztjaiban vizsgálják az intron-alapú és a hosszú 3'UTR-alapú NMD célpont mRNS-ek akkumulációját (Nierniec *et al.*, nem közölt eredmények).

Következő lépésben igazolni akartuk, hogy biztosan az uORF indukálja-e az NMD választ, és nem egyéb indirekt hatásról van szó. Mivel az NMD a transzláció terminációjához kapcsolt folyamat, ahhoz, hogy NMD-t indukáljon az uORF-nak transzlálódnia kell. Az 5'U2-

G riporter konstrukcióban elrontottuk a 2uORF start kodonját, így az első start a főgén start kodonja lett (Eredmények 3A ábra). Az így módosított és NoATG-U2-G-nek nevezett riporter konstrukció és az eredeti 5'U2-G konstrukció NMD szenzitivitását, U1DN ko-infiltráció segítségével hasonlítottuk össze.



Eredmények 3. Ábra: Az uORF translációja kell az NMD indukcióhoz. (A) A kísérletben használt konstrukciók rajza. (B) Az 5'U2-G uORF-alapú teszt konstrukció GFP expressziója gyenge. A NoATG-U2-G teszt konstrukcióban a GFP nagyon erősen expresszál. (C) Az 5'U2-G mRNS erős NMD célpont, míg a NoATG-U2-G mRNS-re már nem hat az NMD. A mRNS szinteket a 7. Általános ábrán leírtak szerint kvantifikáltuk.

Ahogy az várható volt, a NoATG-U2-G módosított riporter konstrukcióban a GFP főgén expressziója drámaian megnőtt az 5'U2-G konstrukcióhoz képest. Szintén megnőtt a GFP mRNS szint, ami a U1DN ko-infiltráció hatására nem nőtt tovább, azaz az uORF translációja nélkül a riporterünk már nem viselkedett NMD célpontként (Eredmények 3B ábra). Sikerült igazolni tehát, hogy az uORF translációja szükséges az NMD indukcióhoz. Abban az esetben ugyanis, ha megakadályoztuk az uORF translációját a mRNS szintre már nincs hatással az NMD.

Összefoglalóan megállapítható, hogy az 5'UTR-ban található translálódó növényi uORF-ok egyes esetekben képesek NMD-t indukálni, így az adott mRNS-ek destabilizációját előidézn.

1.1 Az uORF méretfüggő NMD cisz elem a növényekben.

Arra, hogy miért csak egyes uORF-ok képesek NMD-t okozni számos magyarázatot lehet adni. Előfordulhat, hogy az uORF nem, vagy csak bizonyos körülmények közt

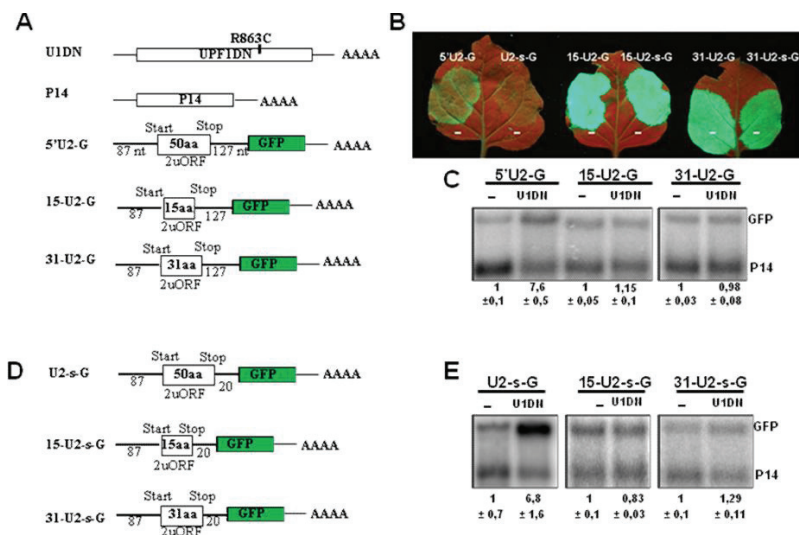
transzlálódik, amikor a növénynek szüksége van az uORF általi NMD szabályozásra. Felmerülhet az a lehetőség is, hogy ezekben az esetekben az uORF nem a mRNS stabilitását, hanem csak a főgén transzlációját befolyásolja (lásd pl. 5'-U3-G). Egy következő lehetőség, hogy az uORF transzlációja után hatékonyabb a reiniciáció. Ennek következtében a főgén transzlációja is megtörténik, ezért a mRNS nem válik NMD célponttá. Mivel az eredményeink azt mutatták, hogy nem minden uORF okoz NMD-t (5'-U3-G, 5'-U5-G), és mivel különbség volt abban is, hogy a különböző általunk vizsgált uORF-ok milyen hatékonysággal indukálták az NMD-t (5'-U2-G > 5'-U1-G > 5'-U4-G), kíváncsiak voltunk mi határozza meg, hogy egy uORF képes vagy nem képes NMD-t indukálni. Ezért olyan az irodalomból már ismert tulajdonságokat kerestünk, melyek befolyásolhatják az uORF-ok működését. Érdekes módon azt találtuk, hogy a legerősebb NMD válasz kiváltására képes 5'-U2-G konstrukció uORF-jának kódoló régiója hosszabb volt, mint a másik négy vizsgált uORF-é. Ahogy azt korábban említettem, emlősökben írták le, hogy minél hosszabb egy uORF kódoló régiója, annál kevesebb az esély a reiniciációra a főgén start kodonjánál (Grant és Hinnebusch, 1994). Ha viszont elmarad a főgén reiniciációja, a mRNS NMD célponttá válhat. Ezért feltételeztük, hogy az uORF hossza nem csak a főgén transzlációjának hatékonyságát befolyásolhatja, hanem az NMD indukáló képességet is. Ezt a hipotézisünket úgy teszteltük, hogy az 5'-U2-G konstrukcióban az 50 aminosav (AS) hosszú 2uORF hosszát 30, illetve 15 aminosavra rövidítettük le (31-U2-G, 15-U2-G). Mivel az uORF kódoló régiójának közepét távolítottuk el, a 2uORF előtti szekvencia rész, az uORF start és stop kontextusa, illetve az intercisztronikus régió (a uORF stop-ja és a főgén start kodonja közti szakasz) mindhárom konstrukció esetén azonos maradt, csak a kódoló régió rövidült (Eredmények 4A ábra). A három teszt konstrukció NMD érzékenységét U1DN ko-infiltrációs kísérletekben vizsgáltuk. Míg a teljes hosszúságú, 50 aminosavas uORF-ot hordozó 5'-U2-G konstrukció továbbra is hatékony NMD célpontnak bizonyult, addig a 15-U2-G és a 31-U2-G konstrukciók már nem indukáltak NMD-t (Eredmények 4B levelek bal oldala, C ábra). Ezek alapján azt gondoljuk, hogy az uORF kódoló régiójának el kell érnie egy bizonyos hosszúságot ahhoz, hogy NMD-t okozhasson. Megvizsgálva az általunk vizsgált uORF-ok (5'-U1, 5'-U2, 5'-U3, 5'-U4, 5'-U5) hosszát arra a következtetésre jutottunk, hogy ez a kritikus hossz kb. 35AS-ra tehető. Eredményeink ugyanis azt mutatják, hogy míg a 38AS hosszú 1uORF és a 41AS hosszú 4uORF képes NMD-t okozni, addig a rövidebb uORF-ok (5'-U5 (29AS), 5'-U3 (29AS)) erre nem képesek.

Röviden összefoglalva a fenti eredményeinket, arra következtethetünk, hogy növényi uORF-ok méretfüggő NMD *cisz* elemek, csak a ~35AS-nál hosszabb, transzlálódó uORF-ok képesek NMD-t indukálni.

1.2 Nem a reiniciáció védi meg a rövidebb uORF-al rendelkező mRNS-eket az NMD-től

Annak, hogy a rövid uORF-ok növényekben miért nem indukálnak NMD-t kétféle oka is lehet. Egyrészt fennállhat a már sokat emlegetett eset, miszerint a főgén hatékony reiniciációja kimentí a PTC-tartalmú mRNS-t az NMD-ből. Élesztőben és emlősökben is kimutatták, hogy a rövidebb uORF-ok után sokkal hatékonyabb a főgén reiniciációja (Vilela és McCarthy, 2003). Egy másik lehetőség, hogy a start kodonhoz nagyon közeli PTC-k nem váltanak ki NMD-t, erre emlősökben találtak példát (Silva *et al.*, 2008).

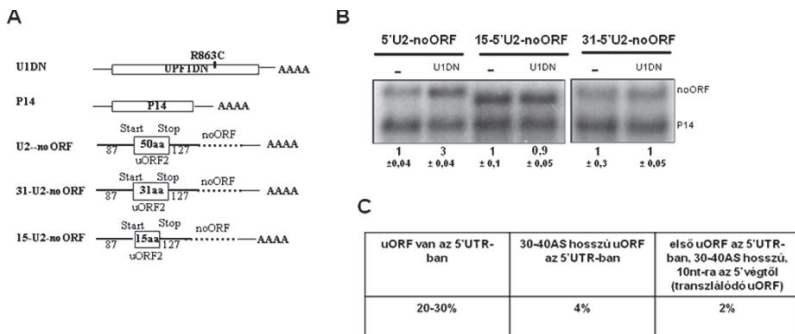
Elsőként azt kívántuk megvizsgálni, hogy vajon a hatékony reiniciáció védi-e meg a rövid uORF-al rendelkező mRNS-eket az NMD-től. Mivel tudjuk, hogy emlősben annál hatékonyabb a reiniciáció, minél hosszabb az intercisztronikus régió, illetve minél rövidebb az uORF kódoló régiója, feltételeztük, hogy az 5'-U2-G-hez (50AS uORF) képest a lerövidített uORF-al rendelkező 31-U2-G és 15-U2-G (31 és 15AS) riporter konstrukciók esetében a főgén hatékonyabb reiniciációja miatt marad el az NMD indukció. Ezt úgy teszteltük, hogy az 5'-U2-G, 31-U2-G és a 15-U2-G konstrukciók intercisztronikus régióját lerövidítettük 127nt-ről 20nt-ra (5'-U2-s-G, 31-U2-s-G és a 15-U2-s-G) erősen csökkentve így a reiniciáció hatékonyságát (Eredmények 4D ábra). A konstrukciókat *N. benthamiana* növényekben U1DN ko-infiltrációs kísérletekben elmeztükben. A GFP fluoreszcencia alapján láthatjuk, hogy a főgén (GFP) expressziója (reiniciációja) a rövidebb interszisztronikus régióval rendelkező 5'-U2-s-G, 31-U2-s-G és a 15-U2-s-G konstrukciók esetében valóban lecsökkent az eredeti, hosszú intercisztronikus régióval rendelkező 5'-U2-G, 31-U2-G és 15-U2-G konstrukciókhoz képest (Eredmények 4B ábra, levelek jobb oldalát hasonlítjuk a bal oldalához). Azonban ha megvizsgáljuk a mRNS szinteket, akkor láthatjuk, hogy továbbra is csak a hosszabb uORF-al rendelkező 5'-U2-s-G riporter állt NMD szabályozás alatt, míg a 31-U2-s-G és a 15-U2-s-G riporter mRNS-ek expresszióját továbbra sem befolyásolta az NMD (Eredmények 4E ábra). Azaz feltehetően nem a hatékony reiniciáció mentette ki a rövidebb uORF-al rendelkező 31-U2-G és a 15-U2-G konstrukciókat az NMD hatás alól.



Eredmények 4. Ábra: Az uORF méretfüggő NMD-t okoz, ami feltehetően független a reinitációtól. (A) A kísérletben használt (rövidebb uORF-al rendelkező) konstrukciók rajza. (B) Levelek bal oldala: Az uORF kódoló régiójának rövidítésével nő a főgen (GFP) expressziója. Levelek jobb oldala: a rövidebb intercisztronikus régióval rendelkező 5'-U2-s-G, 31-U2-s-G és 15-U2-s-G konstrukciók esetén csak a leghosszabb uORF (5'-U2-s-G) képes látványosan csökkenteni a GFP expressziót. (C) Az uORF méretfüggő NMD-t indukál, azaz a hosszabb uORF-al rendelkező 5'-U2-G mRNS erős NMD célpont, míg a rövidebb uORF-ot hordozó 15-U2-G és 31-U2-G transzkriptumok szintjét az NMD nem befolyásolja. (D) A kísérletben használt (rövidebb intercisztronikus régióval rendelkező) konstrukciók rajza. (E) Az intercisztronikus régió rövidítésével továbbra is csak a leghosszabb uORF-ot tartalmazó U2-s-G marad erős NMD célpont, míg a rövidebb uORF-ot hordozó 15-U2-s-G és 31-U2-s-G mRNS-ek már nem állnak NMD szabályozás alatt. A mRNS szinteket a 7. Általános ábrán leírtak szerint kvantifikáltuk.

Ezt megerősítendő újabb kísérleteket végeztünk, amelyben az 5'-U2-G, a 31-U2-G és a 15-U2-G konstrukciókban kicseréltük a GFP-t egy 439nt hosszú szekvenciára, amely egyáltalán nem tartalmazott start (AUG) kodont (5'-U2-noORF, 31-U2-noORF és a 15-U2-noORF) (Eredmények 5A ábra). Így az uORF transzlációja után nem történt reinitáció, azaz a reinitáció semmiképpen sem mentheti ki a mRNS-eket az NMD-ből. A U1DN ko-infiltrációs kísérletek azt mutatták, hogy hasonlóan az előző kísérlethez, ezúttal is csak a hosszabb uORF-al rendelkező 5'-U2-noORF indukált NMD-t (Eredmények 5B ábra). Ezzel

kizártuk annak lehetőségét, hogy a reiniciáció menti ki a rövidebb uORF-ot tartalmazó 31-U2-G és a 15-U2-G konstrukciókat az NMD-ből.



Eredmények 5 Ábra: Nem a reiniciáció védi meg a rövid uORF-ot tartalmazó mRNS-eket az NMD-től. (A) A kísérletben használt konstrukciók rajza. (B) A reiniciáció lehetőségének teljes kizárása után is csak a hosszabb uORF-t hordozó U2-noORF marad NMD szabályozás alatt, a rövidebb uORF-ot tartalmazó 15-U2-noORF és 31-U2-noORF konstrukciók nem állnak NMD szabályozás alatt. A mRNS szinteket a 7. Általános ábrán leírtak szerint kvantifikáltuk (C) Bár a növényi gének 20-30% tartalmaz uORF-ot, mégis csak 2%-a képes NMD-t indukálni. Eredményeink alapján valószínű, hogy ennek legfőbb oka az uORF mérete..

1.3 Az uORF-ot tartalmazó gének csak kis része állhat NMD szabályozás alatt

A növényi gének 20-30%-a tartalmaz uORF-ot, így ezek az NMD *cis* elemek egy jelentős részét képezhetnék. Kísérleteink alapján azonban kijelenthetjük, hogy csak a ~35 aminosavnál hosszabb uORF-ok okoznak NMD-t. Ezek előfordulása viszont az általunk elemzett 5'UTR adatbázis adatok (*Arabidopsis*) alapján már jóval ritkább, nem haladja meg a gének 4%-át (Eredmények 5C ábra). Az NMD indukció szempontjából az uORF mérete mellett az is fontos, hogy hatékonyan transzlálódjon. Ehhez azonban az kell, hogy az uORF start kodonja legyen az első az 5'UTR-ban. Adatbázis adatok azt mutatják, hogy az NMD kritikus hosszúságú uORF-ok csak egy része (2%) található a transzláció szempontjából optimális pozícióban (első uORF az 5'UTR-ban), ezzel tovább csökkentve annak valószínűségét, hogy NMD-t okozzanak. Nagyon valószínű tehát, hogy az uORF-ot tartalmazó gének csak kis százaléka áll NMD szabályozás alatt, melynek legfőbb oka az uORF mérete.

Az eddig elvégzett kísérleteinkről összefoglalóan elmondhatjuk, hogy az 5'UTR-ban található uORF-ok a növényi NMD *cis* elemek egy új, kis csoportját képezik, melyek méretfüggő módon indukálják az NMD-t. Csak a ~35 AS-nál hosszabb, transzlálódó uORF-

ok képesek a mRNS NMD általi destabilizációját kiváltani. Kísérleteink arra utalnak, hogy nem a reiniciáció védi meg a rövidebb uORF-al rendelkező mRNS-eket az NMD-től. Eredményeinket később több kutatás is megerősítette. Kimutatták, hogy az NMD mutáns *Arabidopsis* növényekben (*upf1-5*, *upf3-1*, *smg7-1*) a felülexpresszálo gének közt megjelenik egy transzkriptum csoport, mely konzervált, 30AS-nál hosszabb (35AS-57AS közti) uORF-okat tartalmaz. A rövidebb és nem konzervált uORF-ot tartalmazó transzkriptumok ezzel szemben nincsenek felülreprezentálva az NMD mutáns *Arabidopsis*okban (Rayson *et al.*, 2011).

Arra a kérdésre, hogy mi az oka ennek a méretfüggő NMD válasznak, csak feltevéseink vannak. Növényekben és emlősökben egyaránt kimutatták, hogy a starthoz közeli, nagyon korai stop kodonokat (ez a mi esetünkben a rövidebb uORF-ok stop kodonja lenne) az NMD nem ismeri fel PTC-ként (Hori és Watanabe, 2007). Emlősöknél például, míg egy riporter konstrukció 10. aminosavánál kialakult PTC nem okozott NMD-t, addig ugyanabban a riporterben a 39. aminosavnál megjelenő PTC már nagyon erős NMD-t volt képes kiváltani (Silva *et al.*, 2008). Ennek magyarázatául szolgál az az elmélet, mely szerint a transláció iniciációs komplexének lecserélése az elongációs komplexre fokozatos, így az iniciációs komplexben található eIF4G fehérje is csak fokozatosan válik le az mRNS-ről. Az eIF4G kapcsolatban van a 3'poly(A) végen ülő PABP fehérjével (stabil mRNS hurok szerkezet). A PABP a hatékony termináció kulcseleme, az NMD akkor következik be, ha a PABP-eRF3 kapcsolat hiánya (távolsága) miatt lelassul a transláció terminációja. Ezek alapján azt feltételezik, hogy a nagyon korai PTC-k esetén az eIF4G még kapcsolódik a riboszómához amikor az a PTC-hez ér. Az eIF4G által kötött PABP ilyenkor kisegítheti, hatékonyra teheti a terminációt, így a nagyon korai PTC-ék nem indukálnak NMD-t (Inacio *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2008). Mivel az eIF4G növényekben is bizonyítottan kapcsolódik a PABP-hez, azt gondoljuk, hogy a fenti modell növényekben is megállja a helyét. A rövid uORF-ok terminációja hatékony lehet, hiszen az eIF4G-kapcsolt PABP képes elősegíteni a terminációt. Ezzel szemben a hosszú uORF-ok NMD-t indukálhatnak, ezek terminációja ugyanis lassú, hiszen ilyenkor az eIF4G, illetve a PABP már nem kapcsolódik a riboszómához.

Az eddigi adatok alapján tudjuk, hogy az uORF-ok jóval gyakoribbak a növényi genomban (20-30 %), mint a direkt NMD targetek (1-3%) (Kurihara *et al.*, 2009), ezért nagyon valószínű, hogy az uORF-ok NMD kiváltó hatása szigorúan korlátozva van. A mi eredményeink azt mutatják, hogy az egyik legkorlátozóbb tényező az NMD szempontjából az

uORF-ok mérete (Eredmények 5C ábra), hiszen 35 aminosavnál hosszabb uORF alig a gének 4%-ában azonosítható. Természetesen a rövid uORF-ok is szerepet játszhatnak a főgén expressziójának szabályozásában. Az 5'-U3-G konstrukció (29AS uORF) például nem okoz NMD-t, mégis jelentősen csökkenti a főgén (GFP) expresszióját. Ez megerősíti a korábbi eredményeket, hogy a növényi uORF-ok azáltal is képesek megvalósítani a génexpresszió finomszabályozását, hogy a főgén translációjának hatékonyságát befolyásolják (Tabuchi *et al.*, 2006).

Lehetséges azonban, hogy egyes esetekben a nagyon rövid uORF-ok is képesek NMD-t indukálni. Saul és munkatársai kimutatták, hogy stabil transzgenikus növényekben egy igen rövid, mindössze 13AS hosszú uORF is képes volt NMD-t indukálni (Saul *et al.*, 2009). Ennek magyarázata lehet az eltérő kísérleti rendszer, de az sem kizárt, hogy bizonyos esetekben egy rövid uORF is kiválthat NMD-t. Előfordulhat például, hogy egyes uORF-ok translációja során az eIF4G leválása az elongációs komplexről igen gyors, így a nagyon korai PTC-ek terminációja az eIF4G-kötött PABP hiányában lassú lesz és NMD-t indukál.

Egy újabb kutatás alapján a növényi uORF-ok egy másik típusa, a főgén kódoló régiójával átfedő uORF-ok, is képesek NMD-t indukálni. Meglepő módon ezek az átfedő uORF-ok mérettől függetlenül indukálták az NMD-t (Kalyna *et al.*, 2011). Ennek oka egyelőre nem ismert. Elképzelhető, hogy ezekben az esetekben a főgént transzláló riboszómák, illetve az átfedő uORF translációs terminációját végző riboszómák „torlódása”, elakadása idézheti elő a mRNS gyors degradációját. Ugyanakkor kiemelendő, hogy ezeket a kísérleteket más kutatócsoportok még nem erősítették meg.

Növényekben az uORF-ok működésére vonatkozóan kevés tanulmány és kísérletes munka készült, további kutatásokra van szükség, hogy az uORF-ok valódi szerepét, hozzájárulását a génszabályozáshoz felbecsülhessük.

II. Az intron-alapú növényi NMD rendszer működése és szabályozása

A csoportunk korábban már bebizonyította, hogy az uORF indukálta NMD válasz mellett növényekben másik két jóval elterjedtebb NMD útvonal, a hosszú 3'UTR-alapú, illetve az intron-alapú NMD útvonal is működik. Az intron-alapú NMD rendszer a növényeken kívül csak gerincesekben található meg. Érdekesnek tartottuk részletesen megvizsgálni, hogy van-e hasonlóság a két élőlénycsoportban működő intron-alapú NMD útvonal közt vagy ezek egymástól függetlenül alakultak ki. Mivel az intron-alapú NMD-t emlősköbben hosszú ideje

igen intenzíven tanulmányozzák, kísérleteinkhez az emlős modell szolgált kiinduló pontként. Emlősökben az intron-alapú NMD rendszer kulcs eleme az EJC fehérje komplex, mely az intron kivágódás során, az exon-exon kapcsolódás helyétől ~25nt-ra 5' irányba rakódik az mRNS-re (Buchwald *et al.*, 2010). Az EJC kötő felszínként szolgál a UPF3 és a UPF2 NMD *transz* faktorok számára. A transzláció során a riboszóma lelöki az 5'UTR-ban és a kódoló régióban található EJC komplexeket, de mivel elakad a stop kodonnál, nem tudja eltávolítani a 3'UTR-ban található EJC-ket (Chang *et al.*, 2007) (Általános ábra 3). Kivételt jelent, amikor az EJC nagyon közel van a stop kodonhoz (<25 nt), ilyenkor ugyanis a riboszóma még eléri és képes lelöki az EJC-t. Emlősökben tehát az intronok pozíciófüggő NMD *cisz* elemek, csak a 3'UTR-ban, a stop kodontól legalább 50 nt-ra elhelyezkedő intronok indukálnak NMD-t. Az intron kivágódást és az NMD-t az EJC komplex kapcsolja össze.

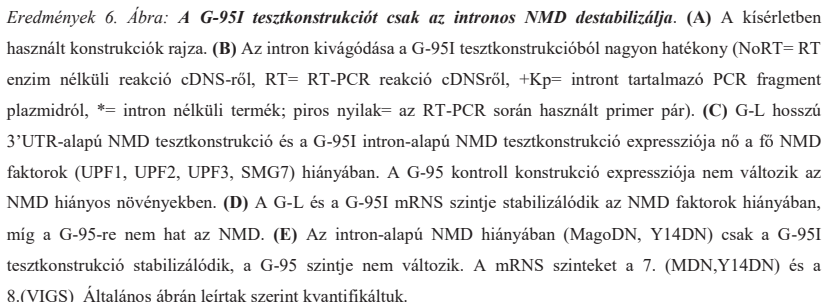
Munkatársaim igazolták, hogy növényekben, akárcsak emlősökben, az intronok pozíciófüggő NMD *cisz* elemek, csak azok az intronok képesek NMD-t okozni, amelyek a 3'UTR-ban, a stop kodontól legalább 50 nt-ra helyezkednek el. Igazolták azt is, hogy minél távolabb van egy intron a stoptól, annál erősebben indukálja az NMD-t (Kerényi F. *et al.*, nem közölt eredmények). Emlősökben az EJC tetramer két heterodimerből szerelődik össze, az Y14-Mago és a 4A3-Barentsz heterodimerekből. A csoportunk korábban már azonosította az emlős EJC két erősen konzervált komponensének, az Y14-nek és Mago-nak a növényi ortológját, és kimutatták, hogy ezek szerepet játszanak a növényi intron-alapú NMD-ben (Kerényi *et al.*, 2008). Ezek alapján feltételeztük, hogy az intron-alapú NMD közvetítésében növényekben is egy a splicing során kialakuló EJC-szerű fehérje komplex vehet részt. Az én feladatom ennek tisztázása, illetve a növényi intron-alapú NMD rendszer működési mechanizmusának és szabályozásának vizsgálata volt.

Az intron-alapú NMD vizsgálatára, a U1DN ko-infiltráción alapuló tranzien NMD tesztrendszer bemutatásakor ismertetett G200I intron-alapú tesztkonstrukció nem volt alkalmas. Kimutattuk ugyanis, hogy a G-200I-ben az intron mellett a 3'UTR maga is képes egy gyenge NMD indukcióra. Így, bár erre a tesztkonstrukcióra jórészt az intron-alapú NMD van hatással, gyengén a hosszú 3'UTR-alapú NMD is szabályozza. A kísérleteinkhez egy olyan tesztkonstrukcióra volt szükségünk, melyet csak az intron-alapú NMD szabályoz. Ezért létrehoztuk a G-95I tesztkonstrukciót, melyben a GFP stop kodon mögé 95 nukleotidra, egy intront építettünk be. A konstrukció 3'UTR-ja túl rövid ahhoz, hogy hosszú 3'UTR-alapú NMD-t okozzon, így elvileg csak az intron-alapú NMD hat rá. Hogy ezt bizonyítsuk, építettünk egy kontroll konstrukciót is, a G-95-t, ami nukleotidra azonos a G-95I-vel, kivéve,

hogy nem tartalmazza az intront (Eredmények 6A ábra). Azaz, a G-95 és G-95I mRNS-ek az intron kivágódást követően azonosak. Ha azt látjuk, hogy a G-95 kontroll konstrukció nem áll NMD szabályozás alatt, de a G-95I tesztkonstrukcióra hat az NMD, akkor csak az intron indukálhatja az NMD-t.

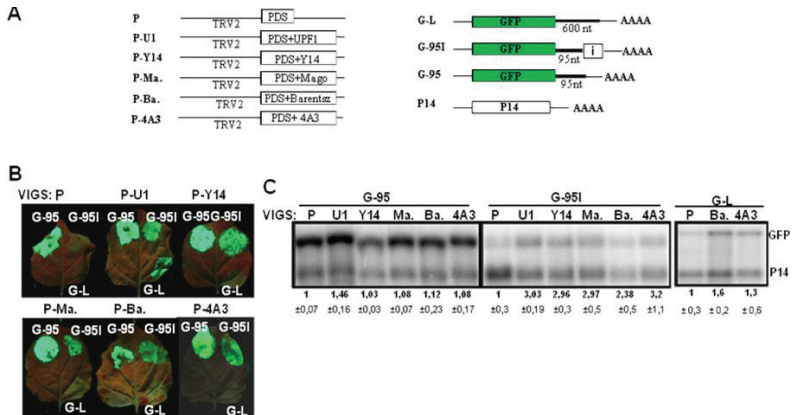
Először megvizsgáltuk, hogy az intron mennyire hatékonyan vágódik ki a G-95I tesztkonstrukcióból. Ahhoz ugyanis, hogy egy intron NMD-t okozzon, ki kell vágódnia. A G-95I és a G-95 tesztkonstrukciókat külön-külön infiltráltuk, majd az infiltrált levélfoltokból kivont RNS-ről egy az intront határoló primerpár segítségével RT-PCR-rel kimutattuk, hogy az intron kivágódása a G-95I mRNS 3'UTR-jából nagyon hatékony (Eredmények 6B ábra). Következő lépésben a VIGS-NMD tesztrendszerben vizsgáltuk a G-95I tesztkonstrukciót. Ha valóban NMD szabályozás alatt áll, akkor bármelyik fő NMD faktor hiányában megnő az expressziója. Hogy ezt megvizsgáljuk UPF1, UPF2, UPF3 és SMG7 VIGS-es növényeket hoztunk létre, majd ezen növények leveleit infiltráltuk a G-95I intron-alapú NMD tesztkonstrukcióval, a G-95 kontroll konstrukcióval, valamint a G-L hosszú 3'UTR-alapú NMD tesztkonstrukcióval. A kísérletből egyértelműen látható, hogy a UPF1-, a UPF2- és az SMG7-csendesített növényekben jelentősen, a UPF3 VIGS-es növényekben pedig kis mértékben, de szignifikánsan nőtt a G-95I és a G-L konstrukciók mRNS szintje. Egyik esetben sem változik viszont a G-95 intron nélküli kontroll transzkriptum szintje (Eredmények 6C,D ábra). Azaz, a G-95I konstrukció valóban NMD szabályozás alatt áll, és ezt a 3'UTR-ban lévő intron váltja ki, hiszen az intron nélküli kontrollra az NMD nem hat. Ezt az eredményünket erősíti meg, hogy amikor a két konstrukciót (G-95, G-95I) az Y14-nek és a Mago-nak a domináns-negatív változataival (Y14DN, MDN) (Kerényi *et al.*, 2008) ko-infiltráltuk, így az intron-alapú NMD-t szelektíven kikapcsoltuk, a G-95I expressziója nőtt, míg a G-95 szint változatlan maradt (Eredmények 6E ábra). Sikertől tehát létrehozni egy kizárólag az intron-alapú NMD által szabályozott G-95I tesztkonstrukciót és egy megfelelő kontroll konstrukciót (G-95). Ezzel a két kísérlettel megerősítettük több korábbi eredményünket is. Igazoltuk, hogy:

- 1, A UPF1, a UPF2 és az SMG7 kell mindkét típusú növényi NMD rendszer működéséhez.
- 2, A UPF3-csendesített növényekben a hosszú 3'UTR-alapú és az intron-alapú NMD rendszer működése is csak részlegesen gátolt. Ennek több oka is lehet, melyeket korábban már ismerttettem (Eredmények I. 44. old.).
- 3, Az Y14 és a Mago csak az intron-alapú növényi NMD rendszerhez kell.



Rendelkezésünkre állt tehát az intron-alapú NMD vizsgálatára alkalmas G-951 tesztkonstrukció. Következő célunk, az eddig még nem azonosított EJC faktorok, a Barentsz és az 4A3 növényi ortológjainak azonosítása, illetve azok növényi intron-alapú NMD-ben betöltött szerepének igazolása volt. Sikertült megtalálni a 4A3-nak megfelelő növényi ortológot, és a Barentsz esetén is azonosítható volt egy korlátozott hasonlóságot mutató, feltételezett ortológ. Feltételeztük, hogy a növényi intron-alapú NMD közvetítésében egy EJC-szerű komplex vesz részt, és azt is valószínűnek véltük, hogy az EJC komplex az emlőskökhöz hasonlóan épül fel. Ha ez igaz, a 4A3 és Barentsz ortológok nélkülözhetetlenek a

növényi intron-alapú NMD-hez. A feltételezésünket tesztelendő, Y14-, Mago-, 4A3-, illetve Barentsz-VIGS növényeket állítottunk elő, majd ezek leveleit a hosszú 3'UTR-alapú (G-L) és az intron-alapú (G-95I) NMD tesztkonstrukciókkal, illetve a G-95 kontroll konstrukcióval infiltráltuk. Negatív kontrollként a PDS csendesített növényeket használtuk, melyekben hibátlanul működik az NMD, míg pozitív kontrollként a UPF1-VIGS növényeket használtuk, mert ezekben mindkét típusú NMD működése gátolt.



Eredmények 7. Ábra: Az EJC komponensek növényekben is kellene az intron-alapú NMD-hez. (A) A kísérletben használt konstrukciók rajza. **(B) Levelek jobb oldala:** UPF1 hiányában a G95I intron-alapú és a G-L hosszú 3'UTR-alapú NMD tesztkonstrukciók expressziója megnő. Az EJC faktorok hiányában csak a G-95I expressziója nő. **Levelek bal oldala:** A G-95 kontroll konstrukció expressziója nem változik egyik NMD faktor hiányában sem. **(C)** A G-95 kontroll konstrukció mRNS szintje nem változik sem a UPF1, sem az EJC faktorok hiányában. A G-95I mRNS szintje a UPF1 és az EJC faktorok hiányában egyaránt megnő. A G-L hosszú 3'UTR-alapú tesztkonstrukció mRNS szintje a Barentsz és 4A3 hiányos növényekben nem emelkedik. A mRNS szinteket a 8. Általános ábrán leírtak szerint kvantifikáltuk.

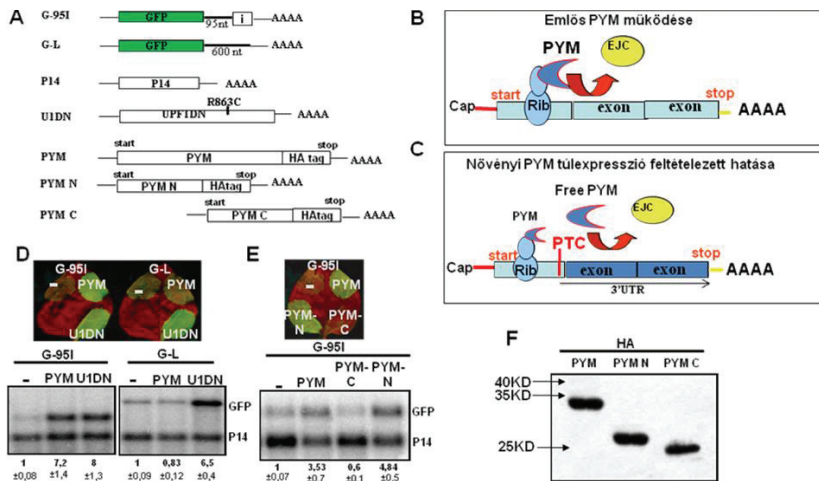
Azt vártuk, hogy ha a növényi intron-alapú NMD működéséhez is szükség van az EJC-re, akkor bármelyik EJC fehérjét csendesítjük, azzal elromlik az intron-alapú NMD, ami az intron-alapú NMD tesztkonstrukció (G-95I) szintjének megemelkedéséhez vezet. A PDS VIGS (P) növényekhez képest a G-95I intron-alapú NMD riporter konstrukció expressziója és mRNS szintje a UPF1-, az Y14- és a Mago-VIGS-es növények mellett a kérdéses 4A3- és a Barentsz-VIGS növényekben is megemelkedett. Ezzel ellentétben, az Y14-, a Mago-, a 4A3- és a Barentsz- VIGS növényekben sem a G-95 kontroll konstrukció, sem a G-L hosszú 3'UTR-alapú NMD riporter konstrukció expressziója nem változott. A G-L expresszió a

UPF1-VIGS növényekben a vártak megfelelően jelentősen nőtt (Eredmények 7B,C ábra, Kerényi *et al.*, 2008). Következtetésként elmondható, hogy a hosszú 3'UTR-alapú NMD működéséhez nincs szükség az EJC-re, hiszen az a növényi EJC komponensek hiányában is zavartalanul működött. Ezzel szemben bármelyik EJC faktor csendesítése az intron-alapú NMD elromlásához vezet. Ezekben a növényekben ezért megnő az intron-alapú NMD tesztkonstrukciók szintje. Kijelenthető tehát, hogy az emlősökhöz hasonlóan, a növényi intron-alapú NMD működéséhez is mind a négy EJC ortológ kell.

II.2 A riboszómához kapcsolt PYM fehérje lehet a felelős a növényi EJC reciklizációjáért

Napjainkban egyre elterjedtebbé vált a különböző multiprotein komplexek szétszerelésének, reciklizációjának vizsgálata. Emlősökben azonosítottak egy a riboszómához kapcsolt fehérjét (PYM), amely a transláció során a riboszómával haladva eltávolítja az EJC-et a mRNS-ről, ezáltal biztosítja a normál mRNS-ek translációját és az EJC reciklizációját (Bono *et al.*, 2004; Bono és Gehring, 2011). Követve az emlős modellt, megvizsgáltuk, hogy növényekben is működik-e, egy a PYM-hez hasonló, az EJC eltávolításában szerepet játszó fehérje. Mivel a PYM konzervált, *N. benthamianában* is könnyen sikerült azonosítani a feltételezett növényi ortológját. Emlősökben kimutatták, hogy bár a PYM fehérje „normál állapotban” szinte kizárólag a riboszómához kötve található, ha mesterségesen túlexpresszáltatik akkor szabad állapotban is előfordulhat (Bono *et al.*, 2004). Ebből kiindulva azt gondoltuk, hogy a növényi PYM azonosításának legegyszerűbb módja, ha agroinfiltrálással túltermeltetjük, így szabad állapotban is megtalálható lesz a növényi sejtekben. Feltételeztük, hogy ezek a szabad PYM-ek nemcsak a kódoló régióból, hanem a 3'UTR-ból is képesek lesznek eltávolítani a EJC-t. Ennek eredménye könnyen kimutatható lenne, hiszen ha a szabad PYM a 3'UTR-ból is eltávolítja az EJC-t akkor az intron-alapú NMD rendszer elomlik (Eredmények 8B,C ábra). Előbbi eredményeink alapján feltételezzük ugyanis, hogy az EJC kell a növényi intron-alapú NMD működéséhez. Ennek megfelelően a feltételezett növényi PYM-et együtt infiltráltuk az intron-alapú NMD tesztkonstrukcióval (G-95I), a kontroll konstrukcióval (G-95), illetve a G-L hosszú 3'UTR-alapú NMD tesztkonstrukcióval. A vártak megfelelően a PYM túlexpresszió hatására drámaian megnőtt a G-95I expressziója és mRNS szintje, jelezve, hogy ezekben a levélfoltokban az intron-alapú NMD működése erősen gátolva van. Ezzel szemben az intron nélküli kontroll (G-95) és a G-L hosszú 3'UTR-alapú NMD tesztkonstrukció nem reagált a PYM túlexpresszióra (Eredmények 8D ábra). Mivel a növényi PYM ortológot HA epitóppal fúziós formában klónoztuk,

expressziója a HA antitest segítségével könnyen detektálható volt. Western blottal igazoltuk, hogy a túlexpresszált PYM fehérje valóban jól kifejeződött az infiltrált levélfoltokban. (Eredmények 8F ábra). Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a PYM szerepe növényekben is az EJC reciklizációja lehet. Következőekben megpróbáltuk funkcionálisan is jellemezni a PYM fehérjét. Emlősökben a PYM N-terminális része kell a EJC-vel való kölcsönhatáshoz, a riboszómával pedig a PYM C-terminális része kapcsolódik. Szétválasztottuk tehát a növényi PYM-et egy N- és egy C-terminális részre (Eredmények 8A ábra), majd ezeket együtt infiltráltuk az NMD tesztkonstrukciókkal. Míg a PYM N-terminális részének túlexpressziója a teljes PYM-hez hasonlóan képes volt elrontani az intron-alapú NMD-t, addig a C-terminális rész túltermelése nem befolyásolta annak működését (Eredmények 8E ábra). Ez arra utal, hogy az emlősökhöz hasonlóan a növényi PYM fehérje is rendelkezik egy EJC-vel kölcsönható N-terminális résszel, illetve egy a riboszómához kapcsolódó C-terminális résszel. Ennél fogva, ha túlradagoljuk a PYM N-terminális részét, akkor képes leelőzni az EJC-t a mRNS-ről, míg a riboszómával kapcsolódó C-terminális rész túlexpressziója nem tudja eltávolítani a 3'UTR-ban lévő, NMD-t okozó EJC-ket. Azt, hogy a csonka PYM N-terminális és PYM C-terminális fehérjék jól kifejeződnek Western blottal igazoltuk (Eredmények 8F ábra). A PYM tehát nemcsak funkcióját, hanem szerkezetét tekintve is nagyon hasonlít az emlősökben megtalálható ortológjához. Szerepe feltehetően az EJC eltávolítása a mRNS-ről. Eredményeink alapján valószínűsíthető, hogy ezt a funkcióját növényekben is úgy valósítja meg, hogy a transzlációt végző riboszómához kapcsolódva halad a mRNS-en és leelőzi a mRNS-re rakódott EJC komplexeket.



Eredmények 8. Ábra: A növényi PYM feltehetően az EJC reciklizációját végzi. (A) A kísérletben használt konstrukciók rajza. (B) Az emlős PYM működése: a riboszómához kapcsolódva a transláció során leléki az mRNS-en lévő EJC-eket. (C) A PYM túlexpresszió következtében megjelenő szabad PYM-ek feltételezett hatása, hogy eltávolítják a mRNS-ről az EJC komplexeket, beleértve a 3'UTR-ban lévő EJC komplexeket is. (D) A G-95I expressziója és mRNS szintje a UIDN és a növényi PYM ortológ ko-infiltrációja esetén is jelentősen megnő. A G-L hosszú 3'UTR-alapú-NMD konstrukcióit csak a UIDN ko-infiltráció stabilizálja. (E) A növényi PYM N-terminális részének (feltételezett EJC kötő rész) túlexpressziója növeli a G-95I expressziót és mRNS szintet. A PYM C-terminális részének (feltételezett riboszóma kötő rész) ko-infiltrációja nem befolyásolja a tesztkonstrukciók expresszióját. (F) Az infiltrált PYM, PYM N és PYM C konstrukciókról képződő fehérjék jól kifejeződnek. A mRNS szinteket a 7. Általános ábrán leírtak szerint kvantifikáltuk.

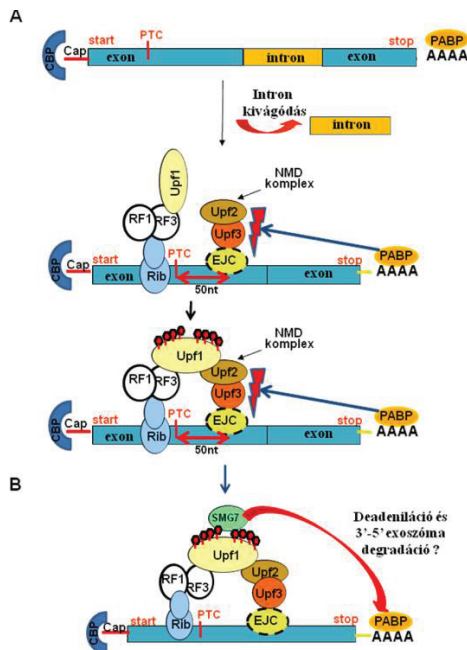
Eredményeinket erősíti az az *Arabidopsis*-ban végzett kutatás, melynek során kimutatták, hogy a növényi PYM kölcsönhatásban van az Y14-Mago heterodimerrel, bár ez az interakció csak gyengén detektálható, valószínűleg a rövid, ideiglenes kölcsönhatás miatt (Park és Muench, 2007).

II.3 A növényi intron-alapú NMD feltételezett működési mechanizmusa

Összegezve az eddigi eredményeket valószínűsíthető, hogy a növényi intron-alapú NMD közvetítésében is egy az emlős EJC-hez hasonló fehérje komplex vesz részt. Bizonyítottuk, hogy ez az EJC komplex a hosszú 3'UTR-alapú növényi NMD működéséhez nem kell. Egy másik, szintén az emlősökben azonosított *transz* faktort, a PYM-et is sikerült azonosítani növényekben. Eredményeink arra utalnak, hogy a növényi PYM mind szerkezetét,

mind működését tekintve megfeleltethető az emlős PYM-nek. Azt, hogy a négy feltételezett EJC komponens növényekben is egy komplexben található, illetve azt hogy az EJC fizikailag kapcsolt a UPF3-hoz, egyelőre sajnos nem tudtuk igazolni. Ennek oka feltételezhetően az, hogy a négy fehérje csak a mRNS-en szerelődik össze, így csak annak jelenlétében stabil. Az általunk alkalmazott, fehérje-fehérje interakciók vizsgálatára kidolgozott IP kondíciók között a ribonukleoprotein komplexek valószínűleg szétesnek. Ezt a problémát kiküszöbölendő a közeljövőben célunk egy formaldehid-fixációval egybekötött ribonukleoprotein IP rendszer felállítása növényekben, amely reményeink szerint lehetővé teszi kevésbé stabil kölcsönhatásban lévő EJC fehérjék interakciójának vizsgálatát is.

Mindezek ellenére eredményeink azt mutatják, hogy az intron-alapú NMD nagyfokon konzervált, növényekben ugyanazok a *transz* faktorok kellenek a működéséhez, mint emlősökben. Munkatársaim igazolták azt is, hogy a növényi intron-alapú NMD *cisz* elemeit tekintve is az emlősökhöz hasonlít. Az intronok ugyanis növényekben is pozíciófüggő NMD *cisz* elemek, csak a 3'UTR-ban, a stop kodontól legalább 50 nt-ra elhelyezkedő intronok képesek NMD-t indukálni, és az NMD válasz erőssége az intronnak a stopptól való távolodásával egyre nő (Kerenyi F. *et al.*, nem közölt eredmények). Valószínű, hogy az EJC az emlősökhöz hasonlóan azáltal gyorsítja fel az NMD-t, hogy kötő felszínként szolgál a UPF3 és UPF2 NMD faktorok számára, így ha kialakul az eRF3-UPF1 kapcsolat, a közeli EJC-hez kötött UPF2 és UPF3 gyors kapcsolódásával az NMD komplex is hamar létrejöhet. Az sem kizárt azonban, hogy a 3'UTR-ban jelen lévő EJC növényekben fizikailag gátolja a PABP-eRF3 kapcsolat kialakulását, így a PABP szignál hiánya váltja ki az NMD komplex összeszerelődését (Eredmények 9A ábra). Egyelőre nem tisztázott pontosan, hogy a UPF1 foszforilációja növényekben az NMD komplex felépülése előtt vagy után következik be. Korábbi eredményeink alapján a foszforilált UPF1-hez a növényi SMG7 kötődik, ami feltehetően a mRNS deadeniláció függő gyors lebomlását eredményezi (Mériai és Benkovics *et al.*, 2012) (Eredmények 9B ábra).

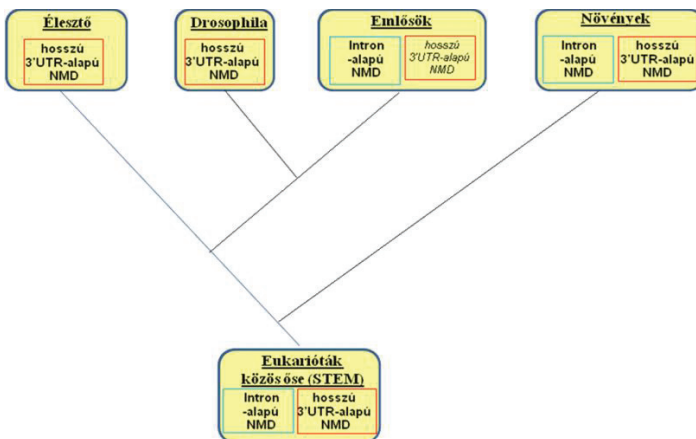


Eredmények 9. ábra: A növényi intron-alapú NMD feltételezett modellje. (A) A 3'UTR-ban található intron kivágódása után, a mRNS-re rakódó EJC-et a riboszóma nem tudja eltávolítani a mRNS-ről, így a mRNS-en kialakulhat a funkcionális NMD komplex (UPF1-UPF2-UPF3). *(B)* Az így megjelölt mRNS-t, az SMG7 által kiváltott gyors deadenilációt követően, feltehetően az exoszóma bontja le.

II.4 Az eukarióta NMD rendszer evolúciója

A fenti eredményeink ellentmondanak a korábbi, NMD evolúcióról alkotott képnek. A hosszú 3'UTR-alapú NMD-ről, mint a gerincesekben, gombákban és gerinctelenekben egyaránt működő, konzervált folyamatról, feltételezték, hogy az NMD legősibb típusa, ami már a mai eukarióták közös őseben (stem eukarióták vagy LECA) is jelen volt. Az intron-alapú NMD-t viszont eddig csak gerincesekben azonosították, ezért azt gondolták, hogy az csak a fejlődés későbbi fázisában, a gerinceseknél alakult ki, párhuzamosan az alternatív splicing általánossá válásával (Rehwinkel *et al.*, 2006; Durand és Lykke-Andersen, 2011). A mi eredményeink azonban cáfolják ezt a modellt, bizonyítottuk ugyanis, hogy az intron-alapú NMD növényekben is működik, és működését, transz-, illetve *cis*z elemeit tekintve is nagyon hasonló az emlősökhöz. Ezek alapján azt gondoljuk, hogy az NMD mindkét ága (az intron-

alapú és a hosszú 3'UTR-alapú) jelen volt már az eukarióták közös őséiben, a stem eukariótákban is. A gerinctelenekhez és a gombákhoz vezető leszármazási vonalakon az evolúció egyes szakaszaiban az intron vesztes jelentős volt (Csuros *et al.*, 2007). Valószínű, hogy egy ilyen szakasz során az intron-alapú NMD eltűnt vagy jelentősége lecsökkent, így a hosszú 3'UTR-alapú NMD vált uralkodóvá (Eredmények 10. ábra). Ezt a feltételezésünket támasztják alá, hogy gerinctelenekben sikerült azonosítani az EJC-et és annak fehérje alkotóit, de ezeknek már kevésbé fontos szerepük van az NMD-ben. Nemrég kimutatták, hogy az intron-alapú NMD ritkán *Drosophilában* is működhet, és ebben az EJC-nek is szerepe van. Annak oka, hogy *Drosophilában* az intron-alapú NMD csak ritkán fordulhat elő az, hogy az EJC stabil kötődése az mRNS-hez csak szigorúan meghatározott szekvencia kontextusban jöhet létre, ami csak a gének kis százalékában van jelen (Sauliere *et al.*, 2010). Gerinctelenekkel ellentétben, a gerincesekben, ahol jelentős intron vesztes nem volt az evolúció során és az alternatív splicing nagyon fontos szerepet kapott a génszabályozásban, az intron-alapú NMD uralkodóvá válhatott. Ennek oka egyes feltevések szerint az, hogy azoknak az alternatív splicinggal keletkező PTC tartalmú mRNS izoformoknak az azonosítása, melyek a 3'UTR-ban intron(oka)t hordoznak, sokkal hatékonyabb lehetett. Az EJC ugyanis kötőfelszínként szolgál a UPF3, UPF2 NMD *transz* faktor számára, ami jelentősen felgyorsíthatja az NMD komplex összeszerelődését ezeken az mRNS-eken (Lynch és Kewalramani, 2003). Így az intron-alapú NMD révén a hibás mRNS-ek felismerése és lebontása nagyon gyorsan megtörténhetett. Bár a hosszú 3'UTR-alapú NMD emlősökben is működik, jóval kevésbé fontos szerepe van az NMD indukcióban (Eberle *et al.*, 2008) (Eredmények 10. ábra). Eredményeink azt mutatják, hogy növényekben mindkét típusú NMD aktív. Mivel növényekben az intron nélküli (20%) és az intront tartalmazó gének is jelentős százalékban megtalálhatóak, illetve az alternatív splicing is általánosnak mondható, feltételezzük, hogy az evolúció során mindkét NMD rendszer fennmaradhatott (Eredmények 10. ábra). Modellünknek megfelelően úgy tűnik, hogy a magasabbrendű növényekhez vezető leszármazási vonalon, hasonlóan a gerincesekhez vezető leszármazási vonalhoz, hosszabb intron vesztes időszak valószínűleg nem fordult elő (Csuros *et al.*, 2007).



Eredmények 10. ábra: Az eukarióta NMD feltételezett evolúciós modellje. Az ősi eukariótákban mindkét típusú NMD létezett. Az élesztőkben és a Drosophilában az intronvesztéssel együtt az intron-alapú NMD is elveszett. Gerincesekben az intron-alapú NMD vált uralkodóvá. Növényekben mindkét NMD rendszer hatékony maradt.

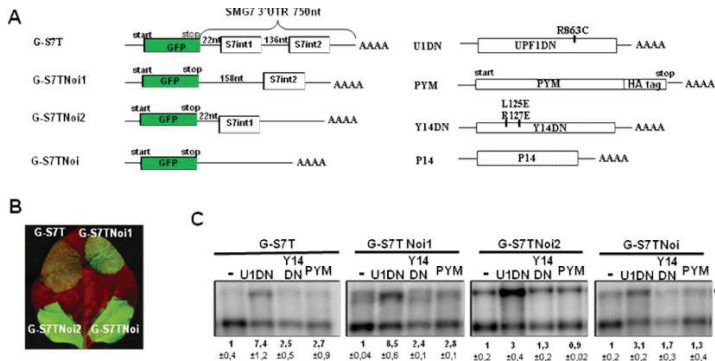
Mindezeket összefoglalva tehát mind az intron-alapú, mind a hosszú 3'UTR-alapú NMD rendszer megtalálható az eddig vizsgált eukariótákban. Míg a gombákban és a gerinctelenekben az evolúció a hosszú 3'UTR-alapú NMD-nek kedvezett, addig gerincesekben az intron-alapú NMD válhatott dominánssá. Növényekben viszont mindkét NMD rendszer hatékony formában fennmaradhatott.

II.5 A növényi NMD rendszer szabályozása.

A növényi NMD sok vad típusú gén finomszabályozásában játszhat szerepet. Fontos lehet ezért, hogy maga az NMD is szabályozva legyen, hiszen a túl intenzív NMD számos gén alulexpresszállódását, míg a gyenge NMD hatás sok gén túlexpresszióját eredményezheti. Feltételeztük ezért, hogy az NMD intenzitása szigorúan szabályozott. A legegyszerűbb szabályozási rendszernek a negatív visszacsatolást gondoltuk, melyben egy vagy több NMD *transz* faktor áll NMD szabályozás alatt. Ebben az esetben, ha túl intenzív az NMD, akkor hatékonyan degradálja az NMD regulálta *transz* faktort, így kevesebb *transz* faktor képződik, ezért csökken az NMD intenzitása. Ha viszont az NMD túl gyengén működik, a *transz* faktorról több fehérje keletkezhet, ami felerősíti az NMD aktivitást.

II.5.1 Az SMG7 megvalósítja mindkét típusú növényi NMD autoregulációját

Korábban a csoportnak már sikerült is igazolnia, hogy a növényi NMD az SMG7 *transz* faktor révén autoregulációs szabályozás alatt áll. Az SMG7 3'UTR-ja szokatlanul hosszú és két intront is tartalmaz. Ha az *Arabidopsis* SMG7 (At5G19400) 3'UTR régióját GFP riporter mögé klónozták (G-S7T, Eredmények 11A ábra), akkor a riporter konstrukció erős NMD célponttá vált (Kerényi *et al.*, 2008). Érdekes módon a zárvatermők körében az SMG7 3'UTR-jának szerkezete (de nem a szekvenciája) nagyon konzervált. Az összes eddig annotált zárvatermőben rendkívül hosszú a 3'UTR és a két intron pozíciója is nagyon hasonló (Függelék 3. táblázat). Az első intron (továbbiakban „stop közeli intron”) minden esetben nagyon közel található a stop kodonhoz (~22nt-ra), így elvben nem válthat ki NMD-t, míg a második intron (továbbiakban „NMD releváns intron”) mindig a stoptól jóval távolabb (158nt-ra), NMD releváns távolságban helyezkedik el. Mivel 1/ a növényi SMG7 mindkét típusú NMD-hez kell, és mivel 2/ az SMG7 3'UTR mindkét típusú NMD *cisz* elemeit hordozza (hosszú 3'UTR-t és NMD releváns intron tartalmaz), feltételeztük, hogy az SMG7 mindkét NMD típus autoregulációját képes megvalósítani. Ennek igazolása az én feladatom volt. Hogy az SMG7 hatását külön az intron-alapú NMD-re és külön a hosszú 3'UTR-alapú NMD-re nézve vizsgálni tudjuk, a munkatársaim által korábban épített G-S7T riporter konstrukciót módosítottam úgy, hogy a GFP mögé klónozott SMG7 3'UTR-jából eltávolítottam a stop közeli- (G-S7TNoi1), az NMD releváns-(G-S7TNoi2), vagy mindkét intront (G-S7TNoi) (Eredmények 11A ábra). Az említett konstrukciók NMD érzékenységét ezek után U1DN, Y14DN és PYM ko-infiltrációs kísérletekben vizsgáltam. Feltételeztük, hogy a G-S7T eredeti 3'UTR-jára, amely tartalmazta az eredeti, hosszú 3'UTR-t a két intronnal együtt, mindkét típusú NMD hatással lesz. Ha ez így van, nem csak a U1DN-nel, hanem az Y14DN-nel és a PYM-mel együtt infiltrált mintákban is megnő az expressziója. Ezzel szemben azt gondoltuk, hogy G-S7TNoi konstrukcióra az intron-alapú NMD már nem lesz hatással, hiszen ennek terminátorából mindkét intron hiányzik. Ezáltal elkülöníthetjük, hogy önmagában a hosszú 3'UTR mennyire járul hozzá az NMD kiváltásához.



Eredmények 11 Ábra: Az SMG7-et mindkét típusú NMD negatívan szabályozza növényekben. **(A)** A kísérletben használt konstrukciók rajza. **(B)** A G-S7T teszt konstrukció GFP expressziója nagyon gyenge. Ha hiányzik a stop közeli intron a 3'UTR-ból (G-S7TNoi1) nő a GFP expresszió. A GFP expresszió tovább erősödik, ha az NMD releváns intront (G-S7TNoi2), illetve ha mindkét intront eltávolítjuk a 3'UTR-ból (G-S7TNoi). **(C)** A G-S7T és a G-S7TNoi1 konstrukciók mRNS szintje U1DN-nel ko-infiltrálva drámaian megemelkedik, Y14DN és PYM jelenlétében az expresszió nő, de a hatás kisebb. Az NMD releváns intron nélküli G-S7TNoi2, illetve az intron nélküli G-S7TNoi konstrukciókra az intron-alapú NMD már nincs hatással, mRNS szintjük csak U1DN jelenlétében emelkedik meg. A mRNS szinteket a 7. Általános ábrán leírtak szerint kvantifikáltuk.

A Northern blot eredmények alapján elmondható, hogy a teljes SMG7 3'UTR régiót tartalmazó G-S7T riporterünk nagyon erős NMD szabályozás alatt áll. U1DN jelenlétében (mindkét NMD inaktív) drámaian megnő a mRNS szintje, de Y14DN és PYM ko-infiltráció hatására (csak az intron-alapú NMD van kikapcsolva) is szignifikáns növekedést mutat (Eredmények 11C ábra). Ahogy az várható volt, az intronokat nem tartalmazó G-S7TNoi konstrukció szintje csak a U1DN ko-infiltráció hatására emelkedik szignifikánsan, jelezve, hogy erre a mRNS-re már csak a hosszú 3'UTR-alapú NMD van hatással (Eredmények 11C ábra). Ez egyben igazolja azt is, hogy az SMG7-re mindkét növényi NMD hat.

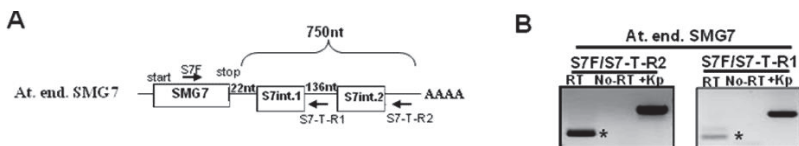
Mivel a G-S7TNoi1 konstrukcióból csak a stop közeli, nem NMD releváns intron hiányzik, feltételeztük, hogy erre a konstrukcióra a G-S7T konstrukcióhoz hasonlóan mindkét NMD hatással lesz. A G-S7TNoi1 valóban jó NMD célpontnak bizonyult, hiszen mindhárom NMD faktor hiányában szignifikánsan megnőtt a GFP mRNS szintje (Eredmények 11C ábra). Érdekes módon azonban, a G-S7TNoi1 konstrukció GFP expressziója némileg erősebb, mint a G-S7T konstrukcióé (Eredmények 11B ábra) (ennek magyarázatát lásd később). A G-S7TNoi2 konstrukcióban a terminátorból az NMD releváns intron hiányzik, ezért a vártan

megfelelően főként a hosszú 3'UTR-alapú NMD van rá hatással (csak U1DN-val infiltrált levélfoltokban nő szignifikánsan a szintje) (Eredmények 11C ábra).

Ezek és a korábbi eredmények (Kerényi *et al.*, 2008) alapján kijelenthető, hogy az SMG7 szabályozásában valóban mindkét típusú növényi NMD-nek szerepe van. Az intron-alapú NMD regulációt az NMD releváns pozícióban lévő intron biztosítja, de a 3'UTR önmagában intronok nélkül is képes NMD-t okozni (Eredmények 15A ábra).

II.5.2 Az SMG7 3'UTR-jában található stop közeli intron elősegíti az NMD releváns intron kivágódását

Bár a stop közeli 1. intronnak elvileg nincs szerepe az NMD-ben mégis nagyon konzerváltan minden zárvatermőben fennmaradt, ezért feltételeztük, hogy valamilyen szabályozó szereppel rendelkezhet. Ezt a feltevésünket támasztja alá, hogy hiányában (G-S7TNoi1) nő a GFP expressziója a G-S7T-hoz képest (Eredmények 11B ábra). Kíváncsiak voltunk ezért, hogy befolyásolja-e, és ha igen hogyan az NMD-t. Mivel egyes növényi intronok képesek befolyásolni, serkenteni a szomszédos intronok kivágódását, felmerült annak a lehetősége, hogy az SMG7 stop közeli intronjának is hasonló szerepe lehet. Elősegítheti például az NMD releváns intron kivágódását. Ennek kiderítéséhez a már bemutatott G-S7T, G-S7TNoi1, G-S7Noi2, G-S7Noi riporter konstrukciókat valamint az endogén SMG7-et használtam.

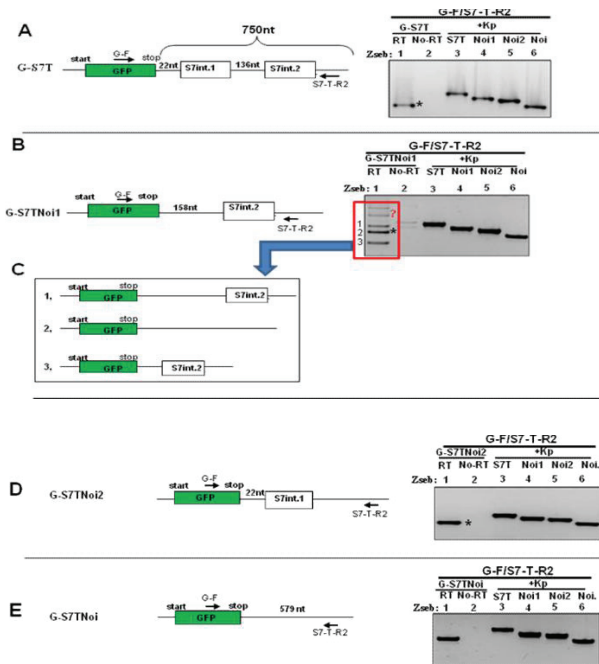


Eredmények 12. Ábra: Az SMG7 3'UTR-jából mindkét intron nagyon hatékonyan kivágódik. (A) Az endogén SMG7 transzkriptum rajza. (B) Az endogén SMG7 3'UTR-jából mindkét intron hatékonyan kivágódik. (NoRT= RT enzim nélküli reakció cDNS-ről oligo dT-vel, RT= RT-PCR reakció cDNS-ről, * intron(ok) nélküli termék(ek), +Kp= intront tartalmazó PCR fragment plazmidről, nyíl = az RT-PCR során használt primer párok).

A konstrukciókat agroinfiltráltuk, 3 nappal az infiltrálást követően RNS-t vontunk ki, azokról oligodT-vel első szálat irtunk. Az első szálról PCR reakcióval, az intronokat határoló primerekkel, vizsgáltuk a két intron kivágódásának hatékonyságát (Eredmények 13 A,B,D,E ábra). Kontrollként megvizsgáltuk az endogén SMG7 3'UTR-ból is az intronok kivágódását (Eredmények 12 A,B ábra). Ehhez *Arabidopsis*ből vontunk ki RNS-t, majd a fent leírthoz

hasonlóan első szálát irtunk és azt PCR-el vizsgáltuk. Eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy ha mindkét intron jelen van a 3'UTR-ban, akkor azok kivágódása úgy endogén, mint heterológ (riporterben) környezetben nagyon hatékony (Eredmények 12 B; Eredmények 13 A ábra 1-es és 6-os zsebek összehasonlítva). Érdekes módon, ha a stop közeli intron hiányzik a 3'UTR-ból (GS7TNoi1), akkor az NMD releváns intron kivágódása már kevésbé hatékony, és alternatív vágás termékek is megjelennek (Eredmények 13 B ábra 1-es zseb). Egyik ilyen alternatív vágás termékben például az NMD releváns intron előtti 3'UTR régió nagy része kivágódik (szekvenálással ellenőriztük), így az intron nagyon közel kerül a stophoz, ezért már nem képes NMD-t indukálni (Eredmények 13 C-3 ábra). Az NMD releváns intron hiányában a stop közeli intron kivágódása ugyanolyan hatékony marad, mint az eredeti terminátorban (Eredmények 13 D ábra 1-es és 6-os zsebek összehasonlítva). Ezek alapján úgy gondoljuk, hogy a stop közeli intron szerepe valóban az NMD releváns intron helyes kivágódásának elősegítése lehet.

Az SMG7 tehát képes érzékelni mindkét növényi NMD intenzitását, azáltal, hogy a 3'UTR régiójában intron-alapú, és hosszú 3'UTR-alapú NMD *cisz* elemeket is hordoz. Az intron-alapú NMD autoregulációjában az SMG7 3'UTR-jában lévő mindkét intron szerepet játszik. Az NMD releváns pozícióban található intron mellett, a stop közeli (nem NMD releváns) intron is hozzájárul az intron-alapú NMD szabályozáshoz, azáltal, hogy elősegíti az NMD releváns intron kivágódását. Az SMG7 3'UTR-ja ugyanakkor az intronok nélkül is elég hosszú, ahhoz, hogy a hosszú 3'UTR-alapú NMD-t hatékonyan indukálja.

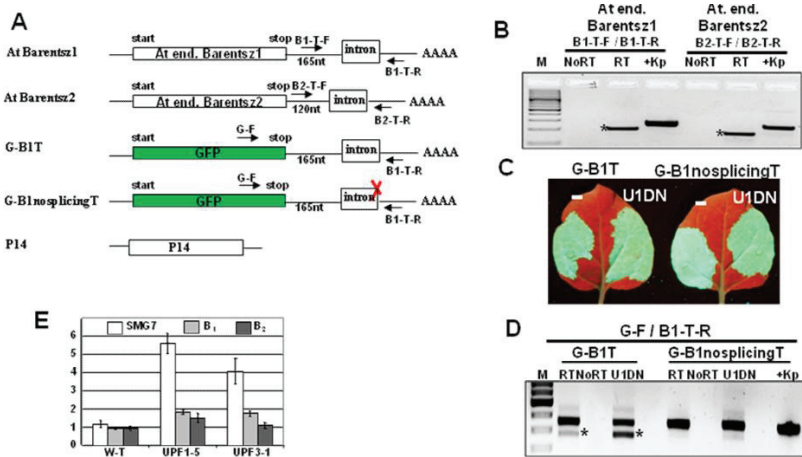


Eredmények 13 Ábra: Az SMG7 3'UTR első intronja (intron1 –stop közeli) kell a második intron (intron2-NMD releváns) hatékony kivágódásához. (A) Az SMG7 3'UTR intronok kivágódása heterológ környezetben, a G-S7T tesztkonstrukcióban, nagyon hatékony. (B) A stop közeli intron hiányában az NMD releváns intron kivágódásának hatékonysága jóval gyengébb, és alternatív vágás termékek is keletkeznek. (C) A stop közeli intron hiányában keletkező vágás termékek: 1- Az NMD releváns intron nem vágódik ki. 2, Az NMD releváns intron kivágódik, így a mRNS izoform intron-alapú NMD célpontá válik. 3, Az NMD releváns intron nem vágódik ki, de kivágódik előtte a terminátor régió nagy része, így az intron közel kerül a stophoz, így a 3'UTR kikerül az intron-alapú NMD szabályozása alól. (D) Az NMD releváns intron hiányában a stop közeli intron kivágódása ugyanolyan hatékony marad, mint az eredeti terminátorban. (E) Mindkét intron hiányzik a 3'UTR-ból, nincs intron kivágódás. Az 1. zseb mindig az adott (infiltrált) tesztkonstrukcióról az RT-PCR után intron határoló primerekkel kapott, intron nélküli PCR fragmentet mutatja. A 3.,4.,5.,6., zsebek a G-S7T, a G-S7TNoI1, a G-S7TNoI2, a G-S7TNoI plazmidokról, az intron határoló primerekkel készült kontroll PCR fragmenteket mutatják (NoRT= RT enzim nélküli reakció cDNSről, RT= RT-PCR reakció cDNS-ről oligo dT-vel, * intron(ok) nélküli termék, +Kp= intront tartalmazó PCR fragment plazmidról, nyíl = az RT-PCR során használt primer párok).

II.5.3 A növényi intron-alapú NMD rendszer szabályozása.

Növényekben a hosszú 3'UTR-alapú és az intron-alapú NMD rendszer is hatékonyan működik. Kíváncsiak voltunk, hogy a két NMD rendszer rendelkezik-e külön autoregulációs ciklussal. Jelen munka során célunk volt megvizsgálni a növényi intron-alapú NMD rendszer lehetséges szabályozási útvonalaait, ezért olyan faktorokat kerestünk, melyek kizárólag az intron-alapú NMD-ben játszanak szerepet. Eddigi eredményeink alapján a PYM, illetve a növényi EJC komplex négy alkotója ideális jelöltnek tűnt, hiszen igazoltuk, hogy ezeknek csak az intron-alapú NMD-ben van szerepük. Megvizsgálva ezen faktorok 3'UTR szerkezetét, azt találtuk, hogy a PYM, az Y14, a Mago és az 4A3 nem hordoz potenciális NMD *cis*z elemeket, viszont mindkét *Arabidopsis* Barentsz homológ (B1- At1G80000 és B2- At1G15280) 3'UTR-jában található egy-egy NMD releváns intron (163, illetve 117 nt-ra a stoptól) (Eredmények 14A ábra). A Barentsz-ek 3'UTR-ja átlagos hosszúságú, ezért a hosszú 3'UTR-alapú NMD feltételezhetően nem hat rájuk. Elképzelhető tehát, hogy a Barentsz mRNS-ek intron-alapú NMD szabályozás alatt állnak. Ezt ellenőrizendő, a GFP riporter gén stopja mögé építettük az *Arabidopsis* B1 3'UTR régióját (G-B1T). Készítettünk egy kontroll konstrukciót is amelyben elrontottuk az intron 3' splice helyét (G-B1nosplicingT), így az intron kivágódását a 3'UTR-ból meggátoltuk (Eredmények 14A ábra). A G-B1T és a G-B1nosplicingT konstrukciók NMD érzékenységét, U1DN ko-infiltrációs kísérletekben vizsgáltuk. Meglepetésre, a G-B1T konstrukció nem viselkedett NMD célpontként. A GFP fluoreszcencia ugyanis erős volt és a U1DN ko-infiltráció hatására sem változott (Eredmények 14C ábra). Szükségesnek véltük ezért megvizsgálni az intron kivágódásnak hatékonyságát. Kimutattuk, hogy míg az endogén *Arabidopsis* B1 mRNS-ből az intron kivágódás nagyon hatékony (Eredmények 14B ábra), addig a G-B1T riporter transzkriptumból az intron kivágódás nagyon gyenge (Eredmények 14D ábra). Ez megmagyarázza, miért nem látunk NMD hatást a G-B1T riporterünknel. Azonban, ha összehasonlítjuk a U1DN ko-infiltrált és a G-B1T önmagában infiltrált minták RT-PCR adatait, láthatjuk azt is, hogy a splicing-on átesett mRNS változatok (*) feldúsulnak a U1DN ko-infiltrált mintákban (Eredmények 14D ábra). Azaz, a Barentsz1 3'UTR intronja heterológ rendszerben csak ritkán vágódik ki, viszont ha kivágódik, akkor NMD-t is okoz. A G-B1nosplicingT konstrukcióból az intron nem vágódik ki, ennek megfelelően az NMD nincs rá hatással. Ezek a kísérletek azt is igazolják, hogy a B1 3'UTR még akkor sem célpontja a hosszú 3'UTR-alapú NMD-nek, ha az intron nem vágódik ki (Eredmények 14D ábra). Mivel az intron kivágódása endogén környezetben nagyon-, heterológ környezetben kevésbé

hatékony, feltételezzük, hogy kivágódását más *cisz* vagy *transz* elemek is befolyásolhatják, melyek csak endogén környezetben vannak jelen. Mivel azonban 3'UTR adatok az *N. benthamiana* esetében nem állnak rendelkezésünkre, csak az *Arabidopsis* SMG7 és Barentsz adatait tudtuk felhasználni.



Eredmények 14. Ábra: A Barentsz expressziót a növényi intron-alapú NMD negatívan szabályozza. (A) A kísérletben használt konstrukciók és az endogén Barentszek szerkezete. (B) A 3'UTR-ban lévő NMD releváns intron kivágódása az endogén Barentsz1-ből, és Barentsz2-ből egyaránt nagyon hatékony. (C) Az *Arabidopsis* Barentsz 3'UTR nem teszi a GFP riporter konstrukciót NMD szabályozottá. (D) Az NMD releváns intron kivágódása a Barentsz1 3'UTR-ből heterológ környezetben, a G-B1T teszt konstrukcióban, kevésbé hatékony. Az intron nélküli G-B1T mRNA izoform (*) erős NMD célpont, U1DN jelenlétében ugyanis jelentősen megemelkedik a szintje. Feltehetően csak az intron-alapú NMD destabilizálja a Barentsz-et, mivel ha az intron nem vágódik ki a G-B1nospllicingT esetében, akkor a riporter nem NMD célpont. (M= méretmarker, NoRT= RT enzim nélküli reakció cDNSről, RT= RT-PCR reakció cDNS-ről oligoT-vel, * intron nélküli termék, +Kp=PCR plazmid kontrollról, ami az intront is tartalmazza, nyíl = az RT-PCR során használt primer párok). (E) qPCR: NMD mutáns *upf1-5* és *upf3-1* *Arabidopsis* növényekben szignifikánsan nő az endogén SMG7, Barentsz1 mRNS-ek szintje. A Barentsz2 mRNS szint nem emelkedik szignifikánsan (Ubiquitin mRNS-re normalizálva).

További bizonyítékunk arra nézve, hogy a Barentsz mRNS-ek valóban az intron-alapú NMD szabályozása alatt állnak, az hogy a *upf3-1*, illetve a *upf1-5* NMD mutáns *Arabidopsis* vonalakban az endogén B1 mRNS szintje szignifikánsan megemelkedik (~2X) (Eredmények 14E ábra). Bár ez nem drámai emelkedés, azt gondoljuk, hogy fiziológiásan elég lehet ahhoz, hogy egy finomszabályozás megvalósulhasson. Érdekes módon, annak ellenére, hogy a B2

3'UTR régiója nagyon hasonló a B1-hez, az endogén B2 mRNS szint csak enyhén, nem szignifikánsan nő az NMD hiányában (Eredmények 14E ábra). Fontos megemlíteni azonban, hogy az általam vizsgált *upf3-1*, illetve a *upf1-5* gyenge NMD mutánsok. Munkatársaim friss eredményei azt mutatják, hogy az erős NMD mutáns *Arabidopsis* vonalakban (*smg7-1*, *upf1-3/pad4*) hasonlóan a gyenge mutánsokhoz a B1 mRNS szint továbbra is csak 2-3x emelkedik. Érdekes módon azonban, ezekben az erős NMD mutáns növényekben a B2 mRNS szintje szignifikánsan 2-2,5X-re megemelkedik. Azt gondoljuk ezek alapján, hogy a B2 kevésbé érzékeny az intron-alapú NMD-re és egyfajta biztonsági szerepe lehet, szükség esetén (pl. nagyon alacsony NMD aktivitásnál) pótolja, illetve kiegészíti a B1 általi NMD autoregulációt. Feltételezhető, hogy az intron-alapú NMD intenzitásának finomszabályozását normál esetben, a B1 által biztosított autoreguláció is képes ellátni. Adatbázisban (phytozome.org) fellelhető 3'UTR adatok alapján valószínűsíthető, hogy az intron-alapú növényi NMD Barentsz általi autoregulációs szabályozása a zárvatermők körében nagyfokon konzervált (Függelék 4. táblázat). Azonban az *Arabidopsis*t és pár közeli rokonát (*Thellungiella halophila*, *Capsella rubella*) kivéve, amelyeknél csak egy intron található a 3'UTR-ban, a többi zárvatermőben a Barentsz 3'UTR-ban kettő vagy ritkábban 3 intron is található. Előfordulhat, hogy ezekben a növényekben a Barentsz intenzívebb NMD szabályozás alatt áll. Megjegyzendő az is, hogy az adatbázis alapján a Barentsz több esetben nem csak NMD releváns intron(oka)t tartalmaz, hanem emellett hosszú 3'UTR-ja is van (Függelék 4. táblázat). Nem kizárt, hogy ezekben az esetekben az intron-alapú NMD mellett a hosszú 3'UTR-alapú NMD is hatással lehet a Barentsz mRNS szintre. Ennek vizsgálatát a közeljövőben tervezzük.

Összefoglalva, bizonyítottuk, hogy a növényi intron-alapú NMD rendszer a Barentsz *transz* faktora révén rendelkezik egy külön autoregulációs ciklussal, az intron-alapú NMD-ben szerepet játszó Barentsz expresszióját ugyanis az intron-alapú NMD regulálja (Eredmények 15B).

II.5.4 Az NMD rendszer autoregulációja eukariótákban

Korábbi (Kerényi *et al.*, 2008) és jelen eredményeinket összefoglalva kijelenthető, hogy a növényi NMD rendszer mindkét ága autoregulációs szabályozás alatt áll. Az SMG7 NMD *transz* faktor úgy a hosszú 3'UTR-alapú, mint az intron-alapú növényi NMD rendszer autoregulációs szabályozását képes megvalósítani. Az SMG7 ugyanis hosszú 3'UTR-rel és egy NMD releváns 3'UTR intronnal rendelkezik, és kísérleteink alapján mindkét NMD *cisz* elem jelentősen hozzájárul az NMD válasz kiváltásához. Az SMG7 3'UTR-ban az NMD *cisz*

elemeken kívül egy stop közeli intron is található, melynek elvileg nem lehet szerepe az NMD-ben. Érdekes megfigyelésünk, hogy a stop közeli intron elősegíti az NMD-releváns intron helyes kivágódását. Ha eltávolítjuk a 3'UTR-ból, akkor az NMD releváns intron kevésbé hatékonyan vágódik ki, vagy a 3'UTR úgy darabolódik, hogy az intron-alapú NMD már nem lesz hatással a terminátorra. Közvetett módon tehát, a stop közeli intron is hozzájárul, az intron-alapú NMD kiváltásához. Ez a jelenség különböző finomszabályozási útvonalakra adhat lehetőséget, ahol az NMD releváns intron kivágódásának hatékonysága szabályozva van. Ez azért lehet egy fontos szabályozási mód, mivel ezzel külön választható lenne, hogy az SMG7 szintet csak a 3'UTR-alapú NMD vagy mindkét NMD befolyásolja-e. Mivel az SMG7 3'UTR szerkezete (hosszú 3'UTR, egy stop közeli és egy NMD releváns intronnal) nagyon konzervált a zárvatermők körében (Benkovics *et al*, 2010; Függelék 3. táblázat) feltételezzük, hogy ez az autoregulációs szabályozási mód nagyon fontos szerepet tölt be abban, hogy az NMD mindig a megfelelő szinten működjön.

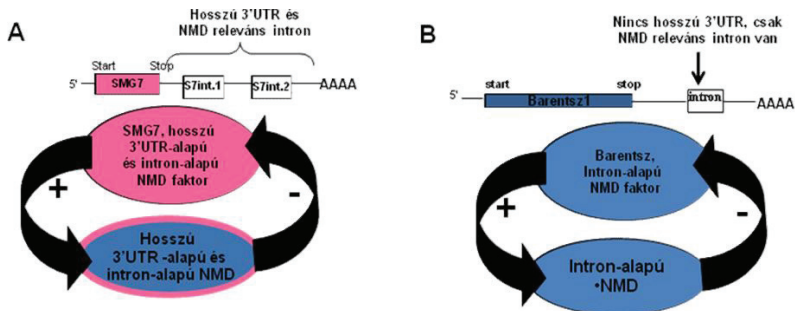
A növényi SMG7-hez hasonlóan, *Drosophilában* az SMG7-el rokon SMG5, emlősökben az SMG5, SMG6 és SMG7 NMD reguláció alatt állnak. Sőt, az élesztőben is azonosítottak egy az SMG7-hez hasonló gént, melynek szintjét az NMD indirekt módon, de negatívan regulálja, (Mendell *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2011). Fontos kiemelni azonban, hogy az SMG7 intron-alapú NMD szabályozása csak a növények esetében jelenik meg. Élesztőben, *Drosophilában* és emlősökben az SMG faktorokra csak a hosszú 3'UTR-alapú NMD hat.

Mindezek alapján azt gondoljuk, hogy az NMD alighanem már az ősi (stem) eukariótákban is SMG7 autoreguláció révén szabályozódott, és ez az autoreguláció az evolúció folyamán fennmaradt. A növényekben az SMG7 3'UTR-ja úgy fejlődött tovább, hogy a hosszú 3'UTR-alapú NMD mellett az intron-alapú NMD-t is érzékeli tudja. Mivel azonban csak zárvatermőkből vannak megbízható adataink, nem tudjuk meghatározni, hogy az SMG7 intron-alapú NMD *cisz* elemei a növények fejlődésének melyik szintjén jelenhettek meg.

Sikerült kimutatni azt is, hogy eukariótákban egyedülálló módon a növényi NMD rendelkezik egy egyedi, csak az intronos NMD aktivitását szabályozó autoregulációs ciklussal is. Ezt a szabályozási kört az EJC-t alkotó Barentsz *transz* faktora révén valósítja meg, melynek 3'UTR-ja maga is intron-alapú NMD szabályozás alatt áll. Az emlős EJC-el kapcsolatos egyes kutatások szerint lehetséges, hogy az EJC csak a citoplazmában éri el

végleges formáját. A 4A3, az Y14 és a Mago még a sejtmagban az érés során kapcsolódik a mRNS-hez, a Barentsz viszont csak a citoplazmába kötődik hozzá (Gehring *et al.*, 2009). Növényekben is vannak adatok arra nézve, hogy a Barentsz csak később csatlakozik a mRNS-hez (Koroleva *et al.*, 2009), így feltételezzük, hogy az EJC Barentsz nélkül is képes ellátni az NMD-től független sejtmagi funkciókat (export, lokalizáció stb). A Barentsz pedig csak később a citoplazmába lépéskor kapcsolódna az EJC-hez, mikor az NMD elkezd vizsgálni a mRNS-t. Így az NMD regulált Barentsz szintje nem lenne hatással az EJC NMD-től független sejtmagi és citoplazmás funkcióira, hanem csak az EJC NMD indukáló képességét befolyásolná, elegánsan függetlenítve az NMD regulációt a többi EJC funkciótól.

Adatbázisban fellelhető adatok alapján valószínűsíthető, hogy a Barentsz általi autoregulációs szabályozás, a zárvatermők körében nagyfokon konzervált, ami a biológiai jelentőségét bizonyítja (Függelék 4. táblázat). Érdekes módon annak ellenére, hogy munkánk során azt találtuk, hogy a növényi intron-alapú NMD mechanizmusát tekintve nagyon hasonlít a gerincesekben működő NMD-re, gerincesekben nem mutatható ki külön csak az intron-alapú NMD-re ható autoreguláció. Emlősekben az eddigi eredmények azt mutatják, hogy annak ellenére, hogy az NMD faktorok nagy része (UPF1, UPF2, UPF3, SMG1, SMG5, SMG6, SMG7) NMD szabályozás alatt áll, ez egyik EJC fehérjéről sem mondható el. Egy másik fontos megfigyelés, hogy a fent említett összes autoreguláció alatt álló emlős NMD faktort csak a hosszú 3'UTR-alapú NMD szabályozza (Huang *et al.*, 2011). Mivel gerincesekben a hosszú 3'UTR-alapú NMD-hez viszonyítva, az intron-alapú NMD sokkal intenzívebben működik, feltételezzük, hogy a hosszú-3'UTR-alapú NMD az adott NMD faktorokra hatva egy sokkal finomabb autoregulációs szabályozást tehet lehetővé. Egy intron-alapú NMD autoreguláció ugyanis nagyon drasztikus változásokat okozna, melyek felboríthatnák a fiziológiásan normális NMD aktivitást. Egy következő magyarázat lehet erre, hogy mivel gerincesekben az intron-alapú NMD dominál, így nincs szükség arra, hogy külön autoregulációs ciklus alakuljon ki az intron-alapú NMD szabályozására, hiszen az a fontosabb NMD faktorok szabályozásával is hatékonyan megvalósítható. Növényekben viszont, ahol mindkét típusú NMD elterjedt, szükség lehet arra, hogy a két NMD útvonal szabályozása bizonyos szinten függetlenítődjön. Talán ezért alakulhatott ki az intron-alapú NMD külön autoregulációja.



Eredmények 15 Ábra: A növényi NMD rendszer autoregulációs ciklusai. (A) Az SMG7-NMD szabályozási kör mindkét típusú növényi NMD autoregulációjára képes. (B) A Barentsz-intron-alapú NMD szabályozási kör: a növényi intron-alapú NMD rendszer autoregulációja.

Eredményeink megerősítik tehát a korábbi feltevésünket, mely szerint az NMD-nek szigorú szabályozás alatt kell állnia. Hogy az NMD működés egybehangelése mennyire fontos, az emlősökben végzett kísérletek is bizonyítják, ahol azt találták, hogy az NMD általi autoreguláció sejt- és szövetspecifikus, sőt a különböző fejlődési stádiumokban is eltérő (Huang *et al.*, 2011). A közeljövőben szeretnénk növényekben is megvizsgálni, hogy van-e eltérés a különböző környezeti tényezők illetve az eltérő fejlődési- és stressz állapotokban az NMD intenzitását tekintve. Ennek feltárása reményeink szerint hozzásegíthet a génszabályozás egy újabb, eddig ismeretlen ágának megértéséhez.

AZ ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALVA

1. Azonosítottuk a növényi NMD *cisz* elemek egy új, eddig ismeretlen csoportját, az 5'UTR-ban található uORF-okat, és kimutattuk, hogy ezek méretfüggő NMD *cisz* elemek.
2. Azonosítottuk a Barentsz és a 4A3 génnek növényi ortológjait, és igazoltuk, hogy ezek fontos szerepet játszanak a növényi intron-alapú-NMD rendszerben.
3. Kimutattuk, hogy a növényi EJC ortológok csak az intron-alapú NMD-ben játszanak szerepet, és valószínűsítettük, hogy az intron kivágódás és az NMD között növényekben is egy EJC-szerű fehérje komplex vesz részt.
4. Valószínűsítettük, hogy a PYM fehérje szerepe az emlőskökhöz hasonlóan növényekben is az EJC eltávolítása a mRNS-ről.
5. Bizonyítottuk, hogy a növényi NMD rendszer komplex autoregulációs szabályozás alatt áll.
6. Kimutattuk, hogy az SMG7 fő NMD faktor mindkét típusú növényi NMD rendszer autoregulációját képes megvalósítani, míg a Barentsz *transz* faktor az intron-alapú növényi NMD-nek biztosít egy külön autoregulációs szabályozást.
7. Fenti adatainkkal hozzájárultunk az NMD evolúciós modelljének újragondolásához.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban témavezetőmnek Dr. Silhavy Dánielnek tartozom köszönettel, aki az elmúlt évek során időt és fáradságot nem kímélve próbálta átadni elméleti tudását és mindig türelemmel irányította munkámat. Elméleti, ismereteim nagy része Tőle származik. Köszönettel tartozom továbbá Dr. Mérai Zsuzsannának, akitől a módszertani ismereteim nagy részét tanultam. Sok támogatást kaptam az RNS biológia csoport régi és jelenlegi tagjaitól, Dr. Hangyáné Benkovics Annától, Dr. Kerényi Zoltántól, Sonkoly Boglárkától, Kerényi Farkastól és Szabadkai Leventétől is, akikkel kölcsönösen segítettük egymást, jól kiegészítve egymás munkáját. Szintén köszönet illeti Prof. Orosz Lászlót, aki lehetővé tette, hogy részt vehessek az ELTE Genetika Tanszék „Klasszikus és Molekuláris Genetika” doktori programjában. Köszönöm a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet jelenlegi igazgatójának, Dr. Burgyán Józsefnek és korábbi igazgatójának Dr. Kiss György Botondnak, hogy a laboratóriumban, az MBK dolgozójaként végezhettem a munkámat. Szeretnék köszönetet mondani a házi védeésre felkért opponenseknek Dr. Várallyay Évának és Dr. Szittyai Györgynek az alapos, értő opponensi véleményekért. Köszönöm asszisztensünk Dóráné Kapusza Edina segítségét is, aki munkájával megkönnyítette kísérleteimet. Végül, köszönettel tartozom a nagyszüleimnek, szüleimnek, testvéremnek és Nagy Lehelnek, akik a kezdetektől bíztattak, és minden szempontból messzemenőig támogattak.

IRODALOMJEGYZÉK

- Amrani, N., Dong, S., He, F., Ganesan, R., Ghosh, S., Kervestin, S., Li, C., Mangus, D. A., Spatrick, P., and Jacobson, A.** 2006. Aberrant termination triggers nonsense-mediated mRNA decay. *Biochem Soc Trans* **34**:39-42.
- Amrani, N., Ganesan, R., Kervestin, S., Mangus, D. A., Ghosh, S., and Jacobson, A.** 2004. A faux 3'-UTR promotes aberrant termination and triggers nonsense-mediated mRNA decay. *Nature* **432**:112-8.
- Arciga-Reyes, L., Wootton, L., Kieffer, M., and Davies, B.** 2006. UPF1 is required for nonsense-mediated mRNA decay (NMD) and RNAi in Arabidopsis. *Plant J* **47**:480-9.
- Atkinson, G. C., Baldauf, S. L., and Hauryliuk, V.** 2008. Evolution of nonstop, no-go and nonsense-mediated mRNA decay and their termination factor-derived components. *BMC Evol Biol* **8**:290.
- Behm-Ansmant, I., Kashima, I., Rehwinkel, J., Sauliere, J., Wittkopp, N., and Izaurralde, E.** 2007. mRNA quality control: an ancient machinery recognizes and degrades mRNAs with nonsense codons. *FEBS Lett* **581**:2845-53.
- Belostotsky, D. A., and Sieburth, L. E.** 2009. Kill the messenger: mRNA decay and plant development. *Curr Opin Plant Biol* **12**:96-102.
- Benkovics, A. H., Nyiko, T., Merai, Z., Silhavy, D., and Bisztray, G. D.** 2011. Functional analysis of the grapevine paralogs of the SMG7 NMD factor using a heterolog VIGS-based gene depletion-complementation system. *Plant Mol Biol* **75**:277-90.
- Bono, F., Ebert, J., Unterholzner, L., Guttler, T., Izaurralde, E., and Conti, E.** 2004. Molecular insights into the interaction of PYM with the Mago-Y14 core of the exon junction complex. *EMBO Rep* **5**:304-10.
- Bono, F., and Gehring, N., H.** 2011. Assembly, disassembly and recycling. The dynamics of exon junction complexes. *RNA Biol.* **8**: 24–29.
- Buchwald, G., Ebert, J., Basquin, C., Sauliere, J., Jayachandran, U., Bono, F., Le Hir, H., Conti, E.** 2010. Insights into the recruitment of the NMD machinery from the crystal structure of a core EJC-UPF3b complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **107**: 10050–10055.
- Chan, W.K., Bhalla, A. D., Le Hir, H., Nguyen' L. S., Huang, L., Géczy, J., and Wilkinson, M. F.** 2009. A UPF3-mediated regulatory switch that maintains RNA surveillance. *Nat Struct Mol Biol* **16**:747-753.
- Chang, Y. F., Imam, J. S., and Wilkinson, M. F.** 2007. The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway. *Annu Rev Biochem* **76**:51-74.
- Chen, C. Y., Ezzeddine, N., and Shyu, A. B.** 2008. Messenger RNA half-life measurements in mammalian cells. *Methods Enzymol* **448**:335-57.

- Csuros, M., Holey, J. A. and Rogozin, I. B.** 2007. In search of lost introns. *Bioinformatics* **23**:87-96.
- Daguenet, E., Baguet, A., Degot, S., Schmidt, U., Alpy, F., Wendling, C., Spiegelhalter, C., Kessler, P., Rio, M.C., Le Hir, H., Bertrand, E., Tomasetto, C.** 2012. Perispeckles are major assembly sites for the exon junction core complex. *Mol Biol Cell*. **23**:1765-82.
- Damian, R. P. and Ueli, G.** 2002. The Art and design of genetic screens: *Arabidopsis Thaliana*. *Nat Rev Genet*. **3**:124-136.
- Doma, M. K., and Parker, R.** 2006. Endonucleolytic cleavage of eukaryotic mRNAs with stalls in translation elongation. *Nature* **440**:561-4.
- Durand, S., and Lykke-Andersen, J.** 2011. SnapShot: Nonsense-mediated mRNA decay. *Cell* **145**: 324-324.
- Eberle, A. B., Stalder, L., Mathys, H., Orozco, R. Z., and Muhlemann, O.** 2008. Posttranscriptional gene regulation by spatial rearrangement of the 3' untranslated region. *PLoS Biol* **6**:e92.
- Eberle, A. B., Lykke-Andersen, S., Muhlemann, O., and Jensen, T. H.** 2009. SMG6 promotes endonucleolytic cleavage of nonsense mRNA in human cells. *Nat Struct Mol Biol* **16**:49-55.
- Filichkin, S. A., Priest, H. D., Givan, S. A. I, Shen, R., Bryant, D. W., Fox, S. E., Wong, W. K., and Mockler, T. C.** 2010. Genome-wide mapping of alternative splicing in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Res* **20**:45-58.
- Frischmeyer, P. A., Hoof, A., O'Donnell, K., Guerrero, A. L., Parker, R., and Dietz, H. C.** 2002. An mRNA surveillance mechanism that eliminates transcripts lacking termination codons. *Science* **295**:2258-61.
- Fukuhara, N., Ebert, J., Unterholzner, L., Lindner, D., Izaurralde, E., and Conti, E.** 2005. SMG7 is a 14-3-3-like adaptor in the nonsense-mediated mRNA decay pathway. *Mol Cell* **17**:537-47.
- Funakoshi, Y., Doi, Y., Hosoda, N., Uchida, N., Osawa, M., Shimada, I., Tsujimoto, M., Suzuki, T., Katada, T., and Hoshino, S.** 2007. Mechanism of mRNA deadenylation: evidence for a molecular interplay between translation termination factor eRF3 and mRNA deadenylases. *Genes Dev* **21**:3135-48.
- Garneau, N. L., Wilusz, J., and Wilusz, C. J.** 2007. The highways and byways of mRNA decay. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**:113-26.
- Gatfield, D., Unterholzner, L., Ciccarelli, F. D., Bork, P., and Izaurralde, E.** 2003. Nonsense-mediated mRNA decay in *Drosophila*: at the intersection of the yeast and mammalian pathways. *Embo J* **22**:3960-70.
- Gazzani, S., Lawrenson, C., Woodward, T., Headon, D., and Sablowski, R.** 2004. A Link Between mRNA Turnover and RNA Interference in *Arabidopsis*. *Science* **306**: 1046-1048

- Gehring, N. H., Lamprinaki, S., Hentze, M. W., and Kulozik, A. E.** 2009. The hierarchy of exon-junction complex assembly by the spliceosome explains key features of mammalian nonsense-mediated mRNA decay. *PLoS Biol* **7**:e1000120.
- Goeres, D. C., Van Norman, J. M., Zhang, W., Fauver, N. A., Spencer, M. L., and Sieburth, L. E.** 2007. Components of the Arabidopsis mRNA decapping complex are required for early seedling development. *Plant Cell* **19**:1549-64.
- Gonzalez, C. I., Ruiz-Echevarria, M. J., Vasudevan, S., Henry, M. F., and Peltz, S. W.** 2000. The yeast hnRNP-like protein Hrp1/Nab4 marks a transcript for nonsense-mediated mRNA decay. *Mol Cell* **5**:489-99.
- Grant, C.M., and Hinnebusch, A.G.** 1994. Effect of sequence context at stop codons on efficiency of reinitiation in GCN4 translational control. *Mol. Cell. Biol* **14**:606-618.
- Hayden, C. A., and Jorgensen, R. A.** 2007. Identification of novel conserved peptide uORF homology groups in Arabidopsis and rice reveals ancient eukaryotic origin of select groups and preferential association with transcription factor-encoding genes. *BMC Biol* **5**:32.
- Hori, K., and Watanabe, Y.** 2005. UPF3 suppresses aberrant spliced mRNA in Arabidopsis. *Plant J* **43**:530-40.
- Hori, K., and Watanabe, Y.** 2007. Context analysis of termination codons in mRNA that are recognized by plant NMD *Plant Cell Physiol.* **48**:1072-1078.
- Houseley, J., and Tollervey, D.** 2009. The many pathways of RNA degradation. *Cell* **136**:763-76.
- Huang, L., Lou, C. H., Chan, W., Shum, E. Y., Shao, A., Stone, E., Karam, R., Song, H. W., Wilkinson, M. F.** 2011. RNA homeostasis governed by cell type-specific and branched feedback loops acting on NMD. *Mol Cell* **43**:950-961.
- Huntzinger, E., Kashima, I., Fauser, M., Sauliere, J., and Izaurralde, E.** 2008. SMG6 is the catalytic endonuclease that cleaves mRNAs containing nonsense codons in metazoan RNA **14**:2609-2617.
- Hwang, J., and Maquat, L., E.** 2011. Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) in animal embryogenesis: to die or not to die, that is the question. *Curr Opin Genet Dev.* **21**: 422–430.
- Inacio, A., Silva, A. L., Pinto, J., Ji, X., Morgado, A., Almeida, F., Faustino, P., Lavinha, J., Liebhaber, S. A., and Romao, L.** 2004. Nonsense mutations in close proximity to the initiation codon fail to trigger full nonsense-mediated mRNA decay. *J Biol Chem* **279**:32170-80.
- Iacano, M., Mignone, F., and Pesole, G.** 2004. uAUG and uORFs in human and rodent 5' untranslated mRNAs. *Gene* **349**:97-105
- Isken, O., and Maquat, L. E.** 2008. The multiple lives of NMD factors: balancing roles in gene and genome regulation. *Nat Rev Genet.* **9**:699-712.

- Jeong, H. J., Kim, Y. J., Kim, S. H., Kim, Y. H., Lee, I. J., Kim, Y. K., Shin, J. S.** 2011. Nonsense-mediated mRNA Decay factors, Upf1 and Upf3, contribute to plant defense. *Plant Cell Physiol.* **52**:2147-2156.
- Kalyna, M., Simpson, C. G., Syed, N. H., Lewandowska, D., Marquez, Y., Kusenda, B., Marshall, J., Fuller, J., Cadle, L., McNicol, J., Dinh, H. Q., Barta, A., and Brown, J. W. S.** 2011. Alternative splicing and nonsense-mediated decay modulate expression of important regulatory genes in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Res* **40**:2454-2469.
- Kashima, I., Yamashita, A., Izumi, N., Kataoka, N., Morishita, R., Hoshino, S., Ohno, M., Dreyfuss, G., and Ohno, S.** 2006. Binding of a novel SMG-1-Upf1-eRF1-eRF3 complex (SURF) to the exon junction complex triggers Upf1 phosphorylation and nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Dev* **20**:355-67.
- Katsuhata, Y. O., Yamashita, A., Kutsuzawa, K., Izumi, N., Hirahara, F., Ohno, S.** 2011. N- and C-terminal Upf1 phosphorylations create binding platforms for SMG-6 and SMG-5: SMG-7 during NMD. *Nucleic Acids Res* **79**:1-16.
- Kearnan, N. R., Gloggnitzer, J., Dekrout, B., Jonak, C., Riha, K.** 2012. Aberrant growth and lethality of Arabidopsis deficient in nonsense-mediated RNA decay factors is caused autoimmune-like response. *Nucleic Acids Res* **19**:5:1-10.
- Kerényi, Z., Merai, Z., Hiripi, L., Benkovics, A., Gyula, P., Lacomme, C., Barta, E., Nagy, F., and Silhavy, D.** 2008. Inter-kingdom conservation of mechanism of nonsense-mediated mRNA decay. *Embo J* **27**:1585-95.
- Kertesz, S., Kerenyi, Z., Merai, Z., Bartos, I., Palfy, T., Barta, E., and Silhavy, D.** 2006. Both introns and long 3'-UTRs operate as cis-acting elements to trigger nonsense-mediated decay in plants. *Nucleic Acids Res* **34**:6147-57.
- Koroleva, O. A., Calder, G., Pendle A. F., Kim, S. H., Lewandowska, D., Simpson, C. G., Jones, I. M., Brown, J. W., and Shaw, P. J.** 2009. Dynamic behavior of Arabidopsis eIF4A-III, putative core protein of exon junction complex: fast relocation to nucleolus and splicing speckles under hypoxia. *Plant Cell* **21**:1592-606.
- Kozak, M.** 2001. Constraints on reinitiation of translation in mammals. *Nucleic Acids Res* **29**:5226-32.
- Kurihara, Y., Matsui, A., Hanada, K., Kawashima, M., Ishida, J., Morosawa, T., Tanaka, M., Kaminuma, E., Mochizuki, Y., Matsushima, A., Toyoda, T., Shinozaki, K., and Seki, M.** 2009. Genome-wide suppression of aberrant mRNA-like noncoding RNAs by NMD in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:2453-8.
- Kuzmiak, H. A., and Maquat, L. E.** 2006. Applying nonsense-mediated mRNA decay research to the clinic: progress and challenges. *Trends Mol Med* **12**:306-16.
- Le Hir, H., Izaurralde, E., Maquat, L. E., and Moore, M. J.** 2000. The spliceosome deposits multiple proteins 20–24 nucleotides upstream of mRNA exon–exon junctions. *EMBO J* **19**:6860–6869.
- Le Hir, H., and Seraphin, B.** 2008. EJCs at the heart of translational control. *Cell* **133**:213-6.
- Lejeune, F., and Maquat, L. E.** 2005. Mechanistic links between nonsense-mediated mRNA decay and pre-mRNA splicing in mammalian cells. *Curr Opin Cell Biol* **17**:309-15.

- Lewis, B. P., Green, R. E., and Brenner, S. E.** 2003. Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:189-92.
- Liang, W., Li C., Liu, F., Jiang, H., Li, S., Sun, J., and Wu, X.** 2009 The Arabidopsis homologs of CCR4-associated factor 1 show mRNA deadenylation activity and play a role in plant defence responses *Cell Res* **19**:307-316.
- Longman, D., Plasterk, R. H., Johnstone, I. L., and Caceres, J. F.** 2007. Mechanistic insights and identification of two novel factors in the *C. elegans* NMD pathway. *Genes Dev* **21**:1075-85.
- Lynch, M., and Kewalramani, A.** 2003. Messenger RNA surveillance and the evolutionary proliferation of introns. *Mol Biol Evol* **20**:563-71.
- McIlwain, D. R., Pan, Q., Reilly, P. T., Elia, A. J., McCracken, S., Wakeham, A. C., Itie-Youten A., Blencowe, B. J., and Mak, T. W.** 2010. Smg1 is required for embryogenesis and regulates diverse genes via alternative splicing coupled to nonsense-mediated mRNA decay. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**:12186-12191.
- Medghalchi, S. M., Frischmeyer, P. M., Mendell, J. T, Kelly A. G., Lawler, A. M., and Dietz, H. C.** 2001. Rent1, a trans-effector of nonsense-mediated mRNA decay, is essential for mammalian embryonic viability. *Hum Mol Genet* **10**:99-105
- Mehta, A., Trotta, C., and Peltz, S.** 2006. Derepression of the Her-2 uORF is mediated by a novel post-transcriptional control mechanism in cancer cells. *Genes Dev* **20**: 939-953
- Mendell, J. T., Sharifi, N. A., Meyers, J. L., Martnez, M. F., and Dietz, H. C.** 2004. Nonsense surveillance regulates expression of diverse classes of mammalian transcripts and mutes genomic noise. *Nat Genet* **36**:1073-1078
- Mérai, Z., Benkovics, A. H., Nyiko, T., Debreczeny, M., Hiripi, L., Kerényi, Z., Kondorosi, E., and Silhavy, D.** 2012. The late steps of plant Nonsense-mediated mRNA decay (NMD). *Plant J.* 10.1111/tpj.
- Moore, M. J., and Proudfoot, N. J.** 2009. Pre-mRNA processing reaches back to transcription and ahead to translation. *Cell* **136**:688-700.
- Muhlemann, O., Eberle, A. B., Stalder, L., and Zamudio O. R.** 2008. Recognition and elimination of nonsense mRNA. *Biochim Biophys Acta* **1779**:538-49.
- Nagy, E., and Maquat, L. E.** 1998. A rule for termination-codon position within intron-containing genes: when nonsense affects RNA abundance. *Trends Biochem Sci* **23**:198-9.
- Orban, T. I., and Izaurrealde, E.** 2005. Decay of mRNAs targeted by RISC requires XRN1, the Ski complex, and the exosome. *RNA* **11**:459-69.
- Park, N. I., and Muench, D. G.** 2007. Biochemical and cellular characterization of the plant ortholog of PYM, a protein that interacts with the exon junction complex core proteins Mago and Y14. *Planta* **225**:625-39.
- Parker, R., and Song, H.** 2004. The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol* **11**:121-7.

- Pulak, R., and Anderson, P.** 1993. mRNA surveillance by the *Caenorhabditis elegans* smg genes. *Genes Dev* **7**: 1885-1897.
- Rajkowsch, L., Vilela, C., Berthelot, K., Ramirez, C. V., and McCarthy, J. E.** 2004. Reinitiation and recycling are distinct process occurring downstream of translation termination in yeast. *J.Mol. Biol.* **335**:71-85.
- Ratcliff, F., Martin-Hernandez, A. M., and Baulcombe, D. C.** 2001. Technical Advance. Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *Plant J* **25**:237-45.
- Rayson, S., Reyes, L. A., Wootton, L., Zabala, M. D. T. T., Truman, W., Graham, N., Grant, M., and Davies B.** 2012. A role for Nonsense-Mediated mRNA decay in Plants: Pathogen responses are induced in *Arabidopsis thaliana* NMD Mutants. *PLoS One* **7**: e31317.
- Rehwinkel, J., Raes, J., and Izaurralde, E.** 2006. Nonsense-mediated mRNA decay: Target genes and functional diversification of effectors. *Trends Biochem Sci* **31**:639-46.
- Reverdatto, S. V., Dutko, J. A., Chekanova, J. A., Hamilton, D. A., and Belostotsky, D. A.** 2004. mRNA deadenylation by PARN is essential for embryogenesis in higher plants. *RNA* **10**:1200-14.
- Riehs, N., Akimcheva, S., Puizina, J., Bulankova, P., Idol, R. A., Siroky, J., Schleiffer, A., Schweizer, D., Shippen, D. E., and Riha, K.** 2008. *Arabidopsis* SMG7 protein required for exit from meiosis. *J Cell Sci* **121**:2208-2216.
- Sachs, M. S., and Geballe, A. P.** 2006. Downstream control of upstream open reading frames. *Genes Dev* **20**:915-921.
- Saiprasad, G. P., Gul, S. A., Anireddy, S. N. R.** 2007. Alternative splicing of pre-mRNAs of *Arabidopsis* serine/arginine-rich proteins: regulation by hormones and stresses. *Plant J.* **49**:1091-1107.
- Sambrook, J., and Russel, D. W.** 2001. *Molecular Cloning, a laboratory manual*. 3rd edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Sarowar, S., Oh, H. W., Cho, H. S., Baek, K. H., Seong, E. S., Joung, Y. H., Choi, G. J., Lee, S., and Choi, D.** 2007. *Capsicum annuum* CCR4-associated factor CaCAF1 is necessary for plant development and defence response. *Plant J* **51**:792-802.
- Saul, H., Elharrar, E., Gaash, R., Eliaz, D., Valenci, M., Akua, T., Avramov, M., Frankel, N., Berezin, I., Gottlieb, D., Elazar, M., David-Assael, O., Tcherkas, V., Mizrachi, K., and Shaul, O.** 2009. The upstream open reading frame of the *Arabidopsis* AtMHX gene has a strong impact on transcript accumulation through the nonsense-mediated mRNA decay pathway. *Plant J* **60**:1031-42.
- Sauliere, J., Haque, N., Harms, S., Barbosa, I., Blanchette, M., and Le Hir, H.** 2010. The exon junction complex differentially marks spliced junctions. *Nat Struct Mol Biol* **17**:1269-71.
- Shyu, A. B., Wilkinson, M. F., and A. van Hoof.** 2008. Messenger RNA regulation: to translate or to degrade. *Embo J* **27**:471-81.

- Silhavy, D., Molnar, A., Lucioli, A., Szittya, G., Hornyik, C., Tavazza, M., and Burgyan, J.** 2002. A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *Embo J* **21**:3070-80.
- Silva, A. L., Ribeiro, P., Inacio, A., Liebhauer, S. A., and Romao, L.** 2008. Proximity of the poly(A)-binding protein to a premature termination codon inhibits mammalian nonsense-mediated mRNA decay. *Rna* **14**:563-76.
- Singh, G., Rebbapragada, I., and Lykke-Andersen, J.** 2008. A competition between stimulators and antagonists of Upf complex recruitment governs human nonsense-mediated mRNA decay. *PLoS Biol* **6**:e111.
- Souret, F. F., Kastenmayer, J. P., and Green, P. J.** 2004. AtXRN4 degrades mRNA in *Arabidopsis* and its substrates include selected miRNA targets. *Mol Cell* **15**:173-83.
- Suzuki, Y., Ishihara, D., Sasaki, M., Nakagawa, H., Hata, H., Tsunoda, T., Watanabe, M., Komatsu, T., Ota, T., and Isogai, T.** 2000. Statistical analysis of the 5' untranslated region of human mRNA using "oligo-capped" cDNA libraries. *Genomics* **64**:286-297.
- Tabuchi, T., Okada T., Azuma, T., Nanmori T., and Yasuda T.** 2006. Post-transcriptional regulation by the upstream open reading frame of the phosphoethanolamine N-methyltransferase gene. *Biosci.Biotechnol.Biochem.* **70**:2330-2334.
- Tharun, S.** 2009. Roles of eukaryotic Lsm proteins in the regulation of mRNA function. *Int Rev Cell Mol Biol* **272**:149-89.
- Thein, S. L., Hesketh, C., Taylor, P., Temperley, I. J., Hutchinson, R. M., Old, J. M., Wood, W. G., Clegg, J. B., and Weatherall, D. J.** 1990. Molecular basis for dominantly inherited inclusion body beta -thalassemia *Proc Natl Acad Sci USA* **87**:3924- 3928.
- Unterholzner, L., and Izaurralde, E.** 2004. SMG7 acts as a molecular link between mRNA surveillance and mRNA decay. *Mol Cell* **16**:587-96.
- Vilela, C., and McCarthy, J. E.** 2003. Regulation of fungal gene expression via short open reading frames in the mRNA 5' untranslated region. *Mol Microbiol* **49**:859-867.
- Walley, J. W., Kelley, D. R., Nestorova, G., Hirschberg, D. L., and Dehesh, K.** 2010. *Arabidopsis* deadenylases AtCAF1a and AtCAF1b play overlapping and distinct roles in mediating environmental stress responses. *Plant Physiol* **152**:866-75.
- Winkler, R.G., and Feldmann, K.A.** 1998. PCR-based identification of T-DNA insertion mutants. *Methods Mol Biol* **82**:129-36.
- White, J. L., and Kaper, J. M.** 1989. A simple method for detection of viral satellite RNAs in small plant tissue samples. *J Virol Methods* **23**:83-93.
- Wittkopp, N., Huntzinger, E., Weiler, C., Sauliere, J., Schmidt, S., Sonawane, M., and Izaurralde, E.** 2009. Nonsense-mediated mRNA decay effectors are essential for zebrafish embryonic development and survival. *Mol Cell Biol* **29**:3517-3528

- Xu, J., Yang, J. Y., Niu, Q. W., and Chua, N. H.** 2006. Arabidopsis DCP2, DCP1, and VARICOSE form a decapping complex required for postembryonic development. *Plant Cell* **18**:3386-98.
- Yamashita, A., Kashima, I., and Ohno, S.** 2005. The role of SMG-1 in nonsense-mediated mRNA decay. *Biochim Biophys Acta* **1754**:305-15.
- Yoine, M., Ohto, M. A., Onai, K., Mita, S., and Nakamura, K.** 2006. The lba1 mutation of UPF1 RNA helicase involved in nonsense-mediated mRNA decay causes pleiotropic phenotypic changes and altered sugar signalling in Arabidopsis. *Plant J* **47**:49-62.
- Zhang, W., Murphy, C., and Sieburth, L. E.** 2010. Conserved RNaseII domain protein functions in cytoplasmic mRNA decay and suppresses Arabidopsis decapping mutant phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**:15981-5.

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

- Nyiko, T.*, Sonkoly, B.*, Merai, Z., Benkovics, A. H., and Silhavy, D.** 2009. Plant upstream ORFs can trigger nonsense-mediated mRNA decay in a size-dependent manner. *Plant Mol Biol* **71**:367-78. (*megosztott első szerzősség) **(IF=3,97)**
- Nyiko, T., Kerényi, F., Szabadkai, L., A. H., Benkovics, Major, P., Sonkoly, B., Merai, Z., Barta, E., Niemiec E., Kufel J. and Silhavy, D.** 2013. Plant nonsense-mediated mRNA decay is controlled by different autoregulatory circuits and can be induced by an EJC-like complex (Nucleic Acids Res NAR-00302-2013- elfogadás alatt (minor revision)) **(IF=8,03)**

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓ EGYÉBB KÖZLEMÉNYEK

- Benkovics, A. H., Nyiko, T., Merai, Z., Silhavy, D., and Bisztray, G. D.** 2011. Functional analysis of the grapevine paralogs of the SMG7 NMD factor using a heterolog VIGS-based gene depletion-complementation system. *Plant Mol Biol* **75**:277-90. **(IF=4,15)**
- Merai, Z., Benkovics, A. H., Nyiko, T., Debreczeny, M., Hiripi, L., Kerényi, Z., Kondorosi, E., and Silhavy, D.** 2012. The late steps of plant Nonsense-mediated mRNA decay (NMD). *Plant J.* 10.1111/tbj. **(IF=6,16)**

NEMZETKÖZI KURZUSOK, ÖSZTÖNDÍJAK

2009: ICGEB “RNA structure and function” elméleti kurzus (1 hét), Olaszország, Trieszt

2010: ENSS (European Networking Summer School) “Plant Epigenetics” elméleti és gyakorlati kurzus (1 hét), Németország, Gatersleben

2011: Varsó-i Egyetem: Protoplaszt transzformáció (3 hét) - gyakorlati képzés az „RNA metabolism” Kutatócsoportban (Csoportvezető: Joanna Kufel), Lengyelország, Varsó

2012: EMBO Short term Fellowship (3hónap) – A transzkripció géncsendesítésben (TGS) szerepet játszó kisRNS-ek szekvencia specifikitásának vizsgálata, „Genetics and Epigenetics” Kutatócsoport (Csoportvezető: Sir David Baulcombe), Nagy –Britannia, Cambridge

2013: Bielefeld-i Egyetem: Formaldehid-fixációval egybekötött ribonukleoprotein IP rendszer módszerének elsajátítása (10 nap) - gyakorlati képzés „Molecular Cell Physiology” Kutatócsoport (Csoportvezető: Prof. Dr. Dorothee Steiger), Bielefeld, Németország

TUDOMÁNYOS ELŐADÁSOK

2008: MBK intézeti napok, Gödöllő, előadói 2. díj

Cím: Hogyan befolyásolják az 5'UTR-ban lévő korai leolvasási keretek az mRNS-ek stabilitását?

2009: Szegedi Minikonferencia, Szeged

Cím: Hogyan befolyásolják az 5'UTR-ban lévő korai leolvasási keretek az mRNS-ek stabilitását?

2011: Fiatal Növénybiológusok Előadássorozata, Szeged, 1. díj

Cím: Hogyan befolyásolják a 3'UTR-ban található intronok az mRNS-ek stabilitását?

2011: Szegedi Minikonferencia, Szeged

Cím: Hogyan biztosítják a növényi sejtek az egyensúlyt a transzláció terminációja, a stop kodon átolvasása és a termináció- kapcsolt mRNS degradáció között?

2011: MBK intézeti napok, Gödöllő, Különdíj

Cím: Hogyan befolyásolják az 5'UTR-ban és a 3'UTR-ban található *cis*z elemek az mRNS-ek stabilitását?

SUMMARY

Nonsense-mediated mRNA Decay (NMD) is a conserved translation-termination dependent, eukaryotic quality control mechanism that identifies and degrades aberrant mRNAs containing premature termination codons (PTC), thereby preventing the accumulation of truncated and potentially harmful dominant-negative proteins. In addition to its quality-control function, NMD constitutes a post-transcriptional pathway to regulate the expression levels of physiological mRNAs. Although the core trans-acting NMD factors Upf1, Upf2, Upf3 and Smg7 are conserved from yeast to mammals, the cis-acting NMD elements are different. In yeast and invertebrates the NMD system identifies a stop codon as a PTC, if the 3'UTR is unusually long (long 3'UTR-based NMD). In mammals, the presence of an intron in the 3'UTR increases the efficiency of NMD, since after splicing an exon-junction complex (EJC) is deposited onto the mRNA, which serves as a binding platform for central NMD factors Upf3, Upf2, and finally Upf1 to form an NMD surveillance complex, leading to rapid mRNA decay (intron-based NMD). Normally the translating ribosome with the help of the associated PYM protein removes EJC from the mRNA unless it locates in the 3'UTR. EJC located in the 3'UTR dramatically intensifies NMD. Previously our group have found that in plants both long 3'UTR-based NMD and intron-based NMD act efficiently, which appear to be unique among eukaryotes. Furthermore they have confirmed, that the core NMD factors (Upf1, Upf2, Upf3, Smg7) are also required for both types of plant NMD, whereas the plant orthologs of Y14 and Mago the two EJC protein are involved only in intron-based plant NMD. Interestingly, except vertebrates, plants are the only eukaryotes in which intron-based NMD is active.

The first part of my PhD program was to experimentally test whether transcripts containing upstream open reading frame (uORF) in its 5'UTR could be a third group of NMD regulated plant targets. I have shown that the translated plant uORFs in the 5'UTR can trigger NMD in a size-dependent manner, 15 or 31 amino acid (aa) long uORFs were unable to activate NMD, while a similar but longer (50 aa long) uORF induced NMD efficiently. Our bioinformatical analysis revealed that relatively few plant mRNAs (2%) harbour uORFs with NMD critical length, explaining why only a small subset of uORF containing genes are regulated by NMD.

The main part of my PhD program was to unravel the molecular mechanism, and the regulation of plant intron-based NMD. In mammals intron-based NMD is mediated by EJC complex containing four core proteins: Y14, Mago, eIF4A3 and Barentsz. Based on our previous results, we hypothesized that plant intron-based NMD could be also mediated by EJC. I have demonstrated that EJC proteins are all necessary for intron-based plant NMD and that they are involved in 3'UTR intron-based plant NMD, perhaps as components of plant EJC. In mammals the ribosome connected PYM protein functions as an EJC disassembly factor to ensure the efficient translation of wild-type mRNA. I have showed that plant EJC is also disassembled by PYM protein. These data suggest that plant and mammalian intron-based NMD show many similarities in their mechanism and factor requirement, strongly supporting our hypothesis that both types of NMD system functioned in stem eukaryotes. NMD also regulates several wild-type transcripts having NMD features, thus NMD activity might modify the expression of many plant genes. We hypothesize that plant NMD should be strictly regulated and the simplest regulatory system would be a feedback control. I have shown that plant SMG7 which is essential for both intron-based and long 3'UTR based NMD activity can sense the efficiency of both types of NMD. I have also demonstrated that plant Barents, which is involved only in intron-based NMD, contain intron-based NMD features and is controlled exclusively by intron-based NMD. Importantly, these autoregulatory loops are conserved within Angiosperms.

ÖSSZEFOGLALÁS

A Nonsense-mediated mRNA Decay (NMD) egy eukariótákban konzervált transzláció függő minőségbiztosítási rendszer, mely a korai stopot (PTC) tartalmazó hibás mRNS-ek azonosítását és degradációját végzi, megakadályozva így a csonka, gyakran domináns-negatív hatású fehérjék keletkezését. A fő NMD *transz* faktorok, a UPF1, UPF2, UPF3 fehérjék az élesztőtől az emlősökig konzerváltak. Eltérőek azonban, az NMD *cisz* elemei. Élesztőben és gerinctelenekben az NMD rendszer azokat a stop kodonokat azonosítja PTC-ként, amelyek után a 3' nem transzlálódó régió (3'UTR) szokatlanul hosszú (hosszú 3'UTR-alapú NMD). Ezzel szemben gerincesekben az NMD azokat a stop kodonokat ismeri fel PTC-ként, amelyek után a 3'UTR régióban intron(ok) található(ak), ugyanis az intron kivágódás során az mRNS-re rakódó fehérje komplex az Exon Junction Complex (EJC), kötő felszínként szolgál a UPF2,3 NMD *transz* faktorok számára. Normális esetben, ha az EJC a mRNS kódoló régiójában van, a riboszómához kapcsolt PYM fehérje a transzláció során lelki a mRNS-ről. Azonban, ha az EJC egy korai stop következtében a 3'UTR-ba kerül, a riboszóma nem képes eltávolítani így az NMD útvonal aktiválódhat (intron-alapú NMD). A csoportunk korábbi munkája során kimutatta, hogy a növényekben a hosszú 3'UTR-alapú és az intron-alapú NMD egyaránt működik. Azonosították továbbá a növényi NMD fő *transz* faktorait és bizonyították, hogy szükségesek mindkét típusú növényi NMD-hez. Azonosították az emlős EJC két komponensének (Y14 és Mago) növényi ortológját is, és kimutatták, hogy ezek szerepet játszanak a növényi intron-alapú NMD-ben. Az intron-alapú NMD rendszer a növényeken kívül csak gerincesekben található meg.

PhD munkám első részében vizsgáltam, hogy a növényi 5'UTR-ban található transzlálódó uORF-ok, képezhetik-e az NMD *cisz* elemek egy harmadik csoportját. Kimutattam, hogy a növényi 5'UTR-ban található transzlálódó uORF-ok méretfüggő NMD *cisz* elemek. A rövidebb uORF-ok (15-,31-AS) nem okoznak NMD-t, míg a hosszabbak (50AS) igen. Mivel a növényi uORF-ok csak kis százaléka (2%) rendelkezik ezekkel az „NMD kritikus” paraméterekkel, ezért valószínű, hogy az uORF indukálta NMD reguláció a gének csak kis százalékát érinti.

Munkám fő célja a növényi intron-alapú NMD rendszer működési mechanizmusának és szabályozásának vizsgálata. Emlősökben az intron-alapú-NMD rendszer az EJC közvetítésével működik, melynek négy fő fehérje alkotója az Y14, Barentsz, Mago és elf4A3. Sikertült igazolnom, hogy a növényi intron-alapú-NMD működéséhez is mind a négy EJC faktorra szükség van. Feltételezzük ezért, hogy az emlőskhöz hasonlóan a 3'UTR intronok növényekben is az EJC közvetítésével okoznak NMD-t. Emlősökben korábban már azonosítottak egy a riboszómához kapcsolt PYM fehérjét, melynek szerepe, hogy a transzláció során eltávolítsa az EJC komplexet a mRNS-ről, biztosítva ezáltal a normál mRNS-ek transzlációját. Eredményeim alapján valószínűsített, hogy a PYM szerepe az emlőskhöz hasonlóan növényekben is az EJC eltávolítása lehet a mRNS-ről. Ezen eredményeink az intron-alapú NMD rendszer meglepően erős konzerváltságát mutatják, alátámasztva hipotézisünket, mely szerint már az ősi eukarióta is rendelkezett mindkét típusú NMD-vel. Az NMD a vad típusú gének jelentős részének szabályozásában is szerepet játszik, ezért az NMD aktivitás regulációja igen fontos lehet. Feltételeztük, hogy a legegyszerűbb szabályozási rendszer egy negatív visszacsatolás lenne. Igazoltam, hogy az SMG7 NMD *transz* faktor úgy a hosszú 3'UTR-alapú, mint az intron-alapú növényi NMD rendszer autoregulációs szabályozását megvalósítja. Bizonyítottam, hogy a növényi intron-alapú NMD rendszer Barentsz *transz* faktora révén egy külön autoregulációs ciklussal is rendelkezik. Zárvatermők körében mindkét autoregulációs mechanizmus nagyfokon konzervált.

FÜGGELÉK

I. NMD tesztkonstrukciók klónozásának részletes leírása

Az 5'U1-G, 5'U2-G, 5'U3-G, 5'U4-G, 5'U5-G riporterek építéséhez az 5'UTR régiókat *A. thaliana* genomi DNS-ről KpnI restrikciós helyet tartalmazó primer párokkal amplifikáltuk (1for1/1rev1, 2for1/2rev1, 3for1/3rev1, 4for1/4rev1, 5for1/5rev1), majd a KpnI emésztés után KpnI vágott BinGFP vektorba, a GFP start kodon elé klónoztuk. A NoATG-U2-G konstrukciót PCR mutagenézissel készítettük az 5'U2-G-t használva templátként. Első lépésben 2for1/uORFmutR illetve uORFmutF/2rev1 primer párokkal 2 db egymással átfedő PCR fragmentet amplifikáltunk, melyekben az uORF ATG kodonját mutagenizáltuk. Ezt a két átfedő fragmentet használva templátként 2for1/2rev1 primerekkel újraszintetizáltuk a teljes 5'U2 régiót, melyben a uORF start kodonja már el volt rontva. Az így kapott mutagenizált fragmentet KpnI-el emésztettük és KpnI vágott BinGFP vektorba a GFP start kodon elé klónoztuk. Az 5'U2-G-ben lévő 2uORF 50AS hosszú kódoló régiójának lerövidítését egy 31-, illetve egy 15AS hosszú uORF-ra (31-U2-G, 15-U2-G) szintén átfedő (overlap) PCR-rel végeztük (31uORF: 5'U2-G templátról 2for1/uORF31asR, uORF31asF/2rev1 PCR; 15uORF: 5'U2-G templátról 2for1/uORF15asR, uORF15asF/2rev1 PCR, majd ezeket az átfedő termékeket templátként használva 2for1/2rev1 PCR). A 31uORF és 15uORF PCR termékeket KpnI-el emésztettük, és a fent említett módon BinGFP vektorba építettük. Az 5'U2-G, 31-U2-G, 15-U2-G konstrukciókban az intercisztronikus régiót (uORF stopja és a GFP start közti szakaszt) 127nt-ről 20nt-ra rövidítettük, csökkentve így a transzláció reiniciáció lehetőségét. Az így módosított klónokat 5'U2-s-G, 31-U2-s-G, 15-U2-s-G-nek neveztük. Ezek létrehozásához a 2for1/2uORF2rövr primerpárt és az 5'U2-G, 31-U2-G, 15-U2-G templátokat használtuk. Az uORF transzlációja utáni reiniciáció teljes kizárása érdekében készítettük az U2-noORF, 31-U2-noORF és 15-U2-noORF tesztkonstrukciókat, melyekben az uORF-ok után kicseréltük a GFP-t egy ORF-ot nem tartalmazó 439nt hosszú szekvenciára. Ezt a noORF szakaszt az 5'U1 régióról PCR mutagenézissel amplifikáltuk, úgy hogy elrontottuk a régióban található egyetlen ATG kodont is (1uORFBamHIF/NoATGR, NoATGF/1uORFXbaIR, majd ezeket használva átfedő templátként 1uORFBamHIF/1uORFXbaIR PCR). Az így kapott noORF PCR fragmentet BamHI/EcoRI-el vágott Bin61S vektorba építettük, majd a noORF szakasz elé KpnI-el az 5'U2-, 31-U2- és 15-U2 UTR régiókat klónoztuk.

G-95I intron-alapú NMD riporter építésekor BinGFP200I templátról, PHA757Bfor és M13for primerekkel készült PCR fragmentet (95nt PHA fragment plusz a burgonya LS intronja) BamHI/EcoRI restrikciós enzimekkel emésztettük, majd BamHI/EcoRI vágott Bin mGFP vektorba a GFP stop kodon és a 35S terminátor mögé klónoztuk. A G-95 kontroll konstrukció előállításához templátként a G-95I konstrukcióval infiltrált *N. benthamiana* levélből kivont RNS-ről oligodT-vel készített első szálát használtuk, mivel ez már nem tartalmazta az LS+ intront. Az első szálról mGFP4for és pFF2rev primerekkel amplifikáltuk a teljes GFP kódoló régiót, illetve a mögötte lévő 95nt hosszú PHA szekvenciát. A PCR fragmentet BamHI/SalI enzimekkel emésztettük és az így kapott már csak a 95nt hosszú PHA PCR fragmentet tartalmazó szakaszt Bin mGFP BamHI/SalI vágott vektorba közvetlenül a GFP stop kodon mögé klónoztuk. A TRV-PDS-Mago, TRV-PDS-Barentsz, TRV-PDS-4A3 VIGS vektorok készítéséhez a NbMagoVIGSF/ NbMagoVIGSR, NbBarVIGSF/ NbBarVIGSR, Nb4A3VIGSF/ Nb4A3VIGSR primerpárokat (kb. 600nt hosszú PCR terméket kapunk mindhárom esetben) és *N. benthamiana* RNS-ről oligo dT-vel készült cDNS templátot használtunk. A PCR termékeket EcoRI-el TRV-PDS vektorba klónoztuk. A növényi PYM-et *Nicotiana tabaccum* cDNS-ről BamHI/EcoRI restrikciós helyeket tartalmazó Nt PYM F/Nt PYM R primerekkel sokszorosítottuk, majd emésztés után BamHI/EcoRI emésztett BinHA Sanyi vektorba, a Ha epitóp mögé klónoztuk, lehetővé téve így a PYM fehérje expressziójának vizsgálatát is. A PYM-N (PYM N terminális része) és PYM-C (PYM C terminális része) fragmenteket NtPYM F/NtPYM N R és NtPYM C F/NtPYM R primer párokkal a BinHA Sanyi vektorba klónozott PYM szekvenciáról amplifikáltuk, és a fent leírt módon BamHI/EcoRI emésztett BinHA Sanyi vektorba klónoztuk. A G-B1T építésekor az At Barentsz1 (At1G80000) terminátor régióját BinGFP BamHI-EcoRI vágott vektorba közvetlenül a GFP stop kodon mögé építettük. A terminátort B1-T-F/B1-T-R primerekkel At genomi DNS-ről szaporítottunk fel. A G-B1nosplicingT klónt a G-B1T módosításával hoztuk létre, úgy hogy PCR mutagenézissel elrontottuk benne a terminátorban lévő NMD releváns intron kivágódásáért felelős 3'splice helyet, így az intron nem tud kivágódni a terminátorból. A mutagenézishez először a B1-T-F/B1-T-3'ssmutR és B1-T-3'ssmutF/ B1-T-R primerpárokkal, G-B1T templátról két fragmentet sokszorosítottunk. Következő lépésben ezeket az átfedő PCR termékeket templátként használva B1-T-F/B1-T-R primerpárral felszaporítottuk a mutagenizált Barentsz1 terminátort, melyet BinGFP vektorba BamHI/EcoRI helyre klónoztunk. Az SMG7 (S7) terminátorban lévő intronok (2db-inton1, intron2) szerepének tisztázásához, valamint annak eldöntéséhez, hogy az SMG7 NMD szabályozás alatt áll-e, az G-S7T konstrukcióból olyan módosított klónokat készítettünk,

melyekben az S7 terminátorból hiányzott vagy az első (G-S7TNoi1) vagy a második (G-S7TNoi2) vagy mindkét intron (G-S7TNoi). Mindhárom konstrukció létrehozásához a már többször ismertetett PCR mutagenézist használtuk. A G-S7TNoi1 esetében a G-F/SMG-T-6idel-R és SMG7-T-6idel-F/SMG7-T-R primerpárokat, a G-S7TNoi2 készítéséhez G-F/SMG-T-7idel-R és SMG7-T-7idel-F/SMG7-T-R primereket használtuk az átfedő mutagenizált PCR termékek létrehozásához. Majd ezeket a PCR termékeket templátként használva G-F/ SMG7-T-R primerekkel felsokszorozítottuk a 1. illetve a 2. intront nem tartalmazó S7 terminátorokat. A GS7TNoi riporter konstrukciót, melyben mindkét intron hiányzik a terminátorból, a G-S7TNoi1 templátról szintetizáltuk első lépésben G-F/SMG-T-7idel-R, SMG7-T-7idel-F/SMG7-T-R primerekkel, majd ezt a két újonnan amplifikált PCR terméket használva templátként a G-F/ SMG7-T-R primerekkel megkaptuk az intronok nélküli S7 terminátort. Mindhárom terminátort BamHI-EcoRI-el vágott Bin GFP vektorba, közvetlenül a GFP stop kodon mögé építettük be.

II. DNS oligonukleotidok listája

1for1	ATCGGGTACCCAACCTCTCTACCCAGATTCCACC
1rev1	ATCGGGTACCAGTAGTTAAAACAAGAACTGA
2for1	ATCGGGTACCCCTCCTCTCTGCTTCACCAC
2rev1	ATCGGGTACCCCTTCGAAATCGAGAGAACAAA
3for1	ATCGGGTACCCCTTCTCCAGTCTTCTTCAGCC
3rev1	ATCGGGTACCAACAGGACCGGTGCAGCTATT
4for1	ATCGGGTACCAAGATACGGCCACGTGTATGA
4rev1	ATCGGGTACCAATTACACGGGAAAAATCGA
5for1	ATCGGGTACCCGCTCTCAGATCTGAAACCTT
5rev1	ATCGGGTACCTTCGGAAATGTCGTTTGTCCG
uORFmutF	AATCGTTTGTGACTGGTGGAAACTAATCCG
uORFmutR	CGGATTAGTTTCCACCAGTCACAAACGATT
uORF31asF	TTGGCCTCGACCAGTGAACGATT
uORF31asR	TCACTGGTCGAGGCCAAAGAGAGGAAGAGAAAA GCT
uORF15asF	TTGGCCTCGACCAGTGAACGATT

uORF15asR	TCACTGGTCGAGGCCAAACTTACCACCGATCGGA TT
2uORF2rövR	CATCGGTACCGCAATCGTTCACGGGTCGA
NoATGF	TGGAGGAGGTAAGGTTGCCACCCA
1uORFBamHIF	CATGGATCCCCATTAACATCACCATCTAATTCA
1uORFXbaIR	CATTTAGAGGTACCCAACCTCTCTACCCA
NoATGR	GGTGGCAACCTTACCTCCTCCA
PHA657B	GAGCGTTCTTCCCGAGTG
M13 For	TGTAAACGACGGCCAGT
mGFP4For	ATAACA AT GAGTAAAGGAGAAGAAGCTT
pff2Rev	AATTCCCTTATCTGGGAACTACTCAC
Nb Mago VIGS F	ACGGATCCAATGGCGGAGTTGGAAGACAA
Nb Mago VIGS R	ACGGATCCTTAAATGGGTTTGATCTTGAA
Nb Bar VIGS R	CATGAATTCCTCTTGTGTGCCACTGTA
Nb Bar VIGS F	TAGGTGAGGAGGATGAAGTAGT
Nb 4A3 VIGS F	CATGAATTCGAGCCGTGGTTTAAAGGATCAGA
Nb 4A3VIGS R	CACGAATTCCTGACTCGGAATCAATCTTAGC
Nt PYM F	CAT GGATCC AT GGCGACCAGAGGAGGAGAAGA
Nt PYM R	CAT GAATTCT TAA ACTACGAGTTTCTTCAG CCT
Nt PYM C F	CATGGATCCGAGTCATTGCAGGATGTTCCGCCG
Nt PYM N R	CATGAATTCTCAAAATGTCTGCACAATATCTCCCA C
B1-T-F	ACTCGGATCCGACTAAGTGGAGTGAAAGGAGG
B1-T-R	GAATTC CA ACCAGAGCGGAGGCATGTCTT
B1-T-3'ss mut F	GTTTTCCCGAGGTTGTTGTGCAATTG
B1-T-3'ss mutR	CAATTGCACAACAACCTCGGGAA
SMG7-T-F	CACTGGATCCGATCAGAATGGAAGAGTAACACG
SMG7-T-R	CACTGAATTCATCGAATCCTCTGCTGGGGTATT
SMG7-T-6idel-F	GTAATTGGGAATGATGCAGGTGAGTGT

SMG7-T-6idel-R	GCATCATCCCCAATTACCGTGTTACTCTTCCATTCTGA
SMG7-T-7idel-F	ATTCAAGGACACAGCTCATGTTG
SMG7-T-7idel-R	AGCTGTGTCCTGAATCCGTCAGGTAGGAAGTGCCCCAC
mGFP4 F	ATAACAATGAGTAAAGGAGAAGAAGCTT
mGFP4 R	GCCGGATCCCTATTGTATAGTTCATCCATGC
P14 F	CGTTACGGATCCATGGAAAATTCC
P14 R	GTCTAGGTCGACCCTTGGATGATTCCAGCG

1.táblázat, a klónozáshoz használt DNS oligonukleotidok pontos szekvenciája. A vastag betű a start és stop kodonokat, a dőlt betű a restrikciós enzimek felismerő helyeit jelzi.

G-F	CATGGTCCTTCTTGAGTTTGTAACAG
B1-T-F	GACTAAGTGGAGTGAAAGGAGG
B1.T-R	ACGCCCACGGCTCAAGCTCAA
B2.T-F	CTCAGGATCCTTTAGGGACACCTTGGCGCAGG
B2- T-R	AGCCACTACGTCCCTTCTCC
S7F	GATCAGAATGGAAGAGTAACACG
S7-T- R1	CAGCAGAACAAGGATCAGTTGG
S7-T- R2	AGTAGCACGAGAAAGGCACT
R1	AATTCCTTATCTGGGAACTACTCAC
At UBI F qRT-PCR	TGCAACCTCTCAAGTTCGTTT TG
At UBI R qRT-PCR	CAAGCAGGACTCCAAGCATTCTTCA
At Bar1 F qRT-PCR	CCAACCAGAACATGGTACCGGAAAT
At Bar1 R qRT-PCR	CCCTGGTTTGCTGCTTGGTAAGAA
At Bar2 F qRT-PCR	GGTCTGGCTCCATTGATTTTCATTG
At Bar2 R qRT-PCR	GGGATCACTCTCATATTC CGCTTCA
At SMG7 F qRT-PCR	TGCCCGTGACAACCTTGATTGTTG
At SMG7 R qRT-PCR	GCTACCAAGGTCGCATCTTTCAATG

2.táblázat, Az RT-PCR-ekhez és a qPCR-ekhez használt DNS oligonukleotidok pontos szekvenciája.

III. Az SMG7 és a Barentsz NMD faktorok 3'UTR szerkezete zárwatermőkben.

SMG7	Annotált 3'UTR-al rendelkező fajok	Annotált 3'UTR-al rendelkező mRNS-ek	Hosszú 3'UTR-alapú és intron-alapú NMD-re szenzitív 3'UTR		Intron-alapú NMD-re szenzitív 3'UTR (Rövid 3'UTR)	Hosszú 3'UTR-alapú NMD-re szenzitív 3'UTR (intronok nélkül)	Nem NMD szenzitív 3'UTR (Rövid 3'UTR intronok nélkül)
			Hosszú 3'UTR egy stop közeli és egy NMD releváns intronnal	Hosszú 3'UTR csak egy NMD releváns intronnal			
Egyszikűek	6	6	6	0	0	0	0
Kétszikűek	20	29	24	2	0	3	Medicago tr.(de hibásan van annotálva)

3.táblázat, Az SMG7 3'UTR szerkezete zárwatermőkben konzervált, mindkét típusú növényi NMD-t érzékeli. A nagyon konzervált SMG7 3'UTR szerkezet egy stop közeli és egy NMD releváns intronnal a hosszú 3'UTR-ban a legtöbb zárwatermőnél jelen van (ez a típusú 3'UTR alábbiakban konzervált 3'UTR-ként említve). (Phytozome.org adatbázis alapján összeállítva -2013 márciusban frissítve).

- ☐ A legtöbb zárwatermőnél az SMG7 3'UTR szerkezete nagyon konzervált.
- ☐ Nincs olyan annotált SMG7 transzkriptum, amelyet csak az intron-alapú NMD szabályozna.
- ☐ 3 db, csak hosszú 3'UTR-al rendelkező SMG7 transzkriptum van. Azonban ezen transzkriptumok mellett mindhárom esetben jelen van az adott fajban, egy konzervált 3'UTR-al rendelkező SMG7 transzkriptum is.
- ☐ A *Medicago truncatula* 3'UTR-ja rövid, intronokat nem tartalmazó 3'UTR-ként van annotálva. Azonban klónozással, majd szekvenálással bizonyítottuk, hogy az annotáció hibás és a *Medicago truncatula* SMG7 3'UTR-ja konzervált.

Barentsz	Annotált 3'UTR-al rendelkező fajok	Annotált 3'UTR-al rendelkező mRNS-ek	Hosszú 3'UTR-alapú és intron-alapú NMD-re szenzitív 3'UTR	Intron-alapú NMD-re szenzitív 3'UTR (Rövid 3'UTR)	Hosszú 3'UTR-alapú NMD-re szenzitív 3'UTR (intronok nélkül)	Nem NMD szenzitív 3'UTR (Rövid 3'UTR intronok nélkül)
Egyszikűek	6	14	11	0	0	3
Kétszikűek	17	28	17	10	0	1

4.táblázat. A Barentsz a zárvatermőkben intron-alapú NMD szabályozása alatt áll. A Barentsz 3'UTR-ja legtöbb esetben egy vagy több NMD releváns intront (2 vagy 3 intron-a táblázatban nem tüntettem fel az intronok számát) tartalmaz, de ezek száma és pozíciója nem annyira konzervált mint az SMG7-nél (Phytozome.org adatbázis alapján összeállítva-2013 márciusban frissítve).

- ☐ A Barentsz 3'UTR –ja sok esetben mindkét NMD-re szenzitív (hosszú a 3'UTR-ja és NMD releváns intront tartalmaz).
- ☐ Kétszikűeknél előfordul, hogy a Barentsz szintet csak az intron-alapú NMD szabályozza, nincs hosszú 3'UTR-ja, csak NMD releváns intronja a 3'UTR-ban.
- ☐ Egy esetben sem fordul elő, hogy a Barentsz szintet csak a hosszú 3'UTR-alapú NMD szabályozza.
- ☐ Rövid intronok nélküli Barentsz 3'UTR, melyre nem hat az NMD. Azonban ezen transzkriptumok mellett mind a 4 esetben jelen van az adott fajban, egy olyan Barentsz transzkriptum is, mely vagy az intron-alapú NMD vagy mindkét típusú NMD szabályozása alatt áll.